



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Parasitologia



Ivana Helena Rocha Oliveira

PROTEOMA DE FRAÇÃO DE MEMBRANA DE
Leishmania (Leishmania) infantum* E DE *L. (L.) amazonensis
E DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM ESTAS ESPÉCIES

Belo Horizonte

2019

Ivana Helena Rocha Oliveira

**PROTEOMA DE FRAÇÃO DE MEMBRANA DE
Leishmania (Leishmania) infantum E DE *L. (L.) amazonensis*
E DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM ESTAS ESPÉCIES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Verano Braga

Área de concentração: Protozoologia

Belo Horizonte

2019

*À minha família, especialmente minha mãe,
por tanto amor.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade, minha orientadora, com quem criei um vínculo que vai além da pesquisa. É enorme minha gratidão por você, pessoa muito querida, humana, repleta de otimismo e sensibilidade. Muito obrigada por nossas discussões científicas motivadoras e também pelas conversas amigáveis. Sou muito agradecida pela sua disponibilidade, confiança, incentivo, pelas oportunidades a mim dadas e por me guiar no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Thiago Verano Braga, por ser sempre tão disponível. Obrigada pelos ensinamentos e por me acompanhar com tanto cuidado.

Ao Prof. Dr. Henrique Figueiredo e Cristiana Perdigão pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Frank Kjeldsen e membros do PR Group, pela amigável recepção, colaboração e por todo o auxílio nas análises.

À Marcella Braga, tão atenciosa e disponível, por toda assistência e orientação.

Aos membros da banca examinadora por contribuírem para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos meus colegas e ex-colegas do Laboratório de Leishmanioses: Andreza, Angélica, Bárbara, Bruna, Elaine, Flávia, Heloíne, Jordanna, Júnior, João Carlos, Ramon Vieira, Simone, Thaísa e Valéria, pela convivência harmoniosa e alegre, e pelo apoio em todos os momentos.

À Adriana Raabe pela ajuda nas análises no MALDI e, especialmente, pela amizade, carinho e paciência.

Aos meus amigos Ana Paula, Andressa, Ramon Brito e Thallytha, com os quais construí uma linda amizade.

Aos meus pais, minha fortaleza, por estarem ao meu lado em todos os momentos. Sou eternamente grata pelo amor, proteção, incentivo e dedicação de vocês.

À minha irmã e amiga Isis, pela cumplicidade e por trazer alegria a minha vida.

À minha avó Lenita, pela inspiração e por tanto carinho.

Ao Richard, por acreditar tanto em mim. Obrigada pelo amor, companheirismo e paciência.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo, por compreender minhas ausências e vibrar a cada conquista.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG.

A todos os funcionários, professores e colegas do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, especialmente à Sumara e Sibebe.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Leishmania (L.) infantum é agente etiológico da leishmaniose visceral, enquanto *L. (L.) amazonensis* é responsável por causar as formas cutânea e cutâneo-difusa da doença, podendo ser capaz de visceralização em diversos hospedeiros. Este amplo espectro de manifestações clínicas das leishmanioses depende de fatores do hospedeiro e da espécie do parasito. As proteínas desempenham papel fundamental na interação entre *Leishmania* e os macrófagos, as principais células infectadas no hospedeiro vertebrado. Visando contribuir para o melhor entendimento da biologia de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* e sua relação com o hospedeiro, o presente trabalho utilizou: a) proteômica *shotgun label-free* para comparar os níveis de abundância do sub-proteoma de membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*; e b) DIGE e marcação de peptídeos com etiquetas isobáricas (TMT) seguida de LC-MS/MS para investigar proteínas diferencialmente abundantes em macrófagos de Balb/C infectados por estas duas espécies. Um total de 2033 e 2243 proteínas foram identificadas em *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente, das quais 1908 proteínas quantificadas foram compartilhadas entre as espécies. Segundo a predição de localização subcelular, 394 destas proteínas pertenciam à membrana plasmática, sendo a maioria (320 proteínas) presente em ambas as espécies, 18 exclusivamente detectadas em *L. (L.) infantum* e 56 em *L. (L.) amazonensis*. Após análise estatística, foram encontradas 106 proteínas de membrana plasmática reguladas, sendo 32 de *L. infantum* e 74 de *L. amazonensis*. Estas proteínas representaram processos consideravelmente distintos nas espécies, como regulação da transdução de sinal mediada por óxido nítrico e comunicação celular em *L. (L.) infantum*, e localização e atividade enzimática em *L. (L.) amazonensis*. As proteínas envolvidas nesses processos incluíram gp63, um conhecido fator de virulência, bem como membros da superfamília do transportador ABC. Por outro lado, ao utilizar DIGE para comparar *spots* diferencialmente intensos de macrófagos murinos infectados, foi observado um total de 2,4% (29/1.185) de *spots* diferencialmente intensos. *Leishmania (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* induziram uma alteração semelhante na célula hospedeira, uma vez que 11 *spots* foram selecionados como diferencialmente intensos em cada espécie e somente 7 no grupo controle. Já na abordagem utilizando TMT e LC-MS/MS para comparar os perfis de abundância proteica de macrófagos infectados e não infectados, 5.939 proteínas de *Mus musculus* foram identificadas. Destas, 240 e 263 proteínas foram identificadas como diferencialmente reguladas após a infecção por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente, enquanto 170

proteínas foram comumente reguladas na infecção pelas duas espécies. As análises de enriquecimento de ontologia gênica (GO) indicaram que a infecção por *Leishmania* altera mecanismos apoptóticos no macrófago e induz alterações epigenéticas que podem afetar a transcrição gênica da célula hospedeira. Além disso, a diminuição da abundância de proteínas como Pycard e Myd88 parece influenciar o processo inflamatório na infecção por *L. (L.) amazonensis*, enquanto as proteínas Tap1 e Erap1, diferencialmente mais abundantes após a infecção por *L. (L.) infantum*, são envolvidas com a resposta imune adaptativa. As proteínas diferencialmente reguladas identificadas neste trabalho parecem desempenhar importante papel na biologia das espécies de *Leishmania* e na resposta imune de macrófagos, podendo, também, auxiliar no entendimento dos fatores que determinam o curso da infecção. Os resultados encontrados oferecem inúmeras possibilidades de investigação de alvos para terapêutica, diagnóstico e vacinas para leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania*, proteômica, membrana plasmática, macrófagos

ABSTRACT

Leishmania (L.) infantum is the causative agent of visceral leishmaniasis, while *L. (L.) amazonensis* is responsible for localized cutaneous and diffuse leishmaniasis, being able to visceralize in many hosts. The wide range of clinical manifestations of leishmaniasis depend on factors of the host, such as the immune response, and the species of *Leishmania* involved in the infection. Proteins play a pivotal role in the interaction between *Leishmania* and the macrophage, the main infected cell in the vertebrate host. To pursue our goal, we performed: a) shotgun label-free proteomics to compare abundance levels of plasma membrane sub-proteome of *L. (L.) infantum* and *L. (L.) amazonensis* promastigotes and b) DIGE and isobaric peptide labeling (TMT) followed by LC-MS/MS to investigate differentially abundant proteins of Balb/C macrophages infected with these species. The total number of proteins identified in *L. (L.) infantum* and *L. (L.) amazonensis* was 2,033 and 2,243, respectively. Both species shared 1908 of these quantified proteins. After cell localization prediction, 394 proteins were described as plasma membrane-associated proteins and their majority (320 proteins) was presented in both species. Eighteen proteins were detected only in *L. (L.) infantum* and 56 proteins in *L. (L.) amazonensis*. Thirty-two plasma membrane-associated proteins were regulated in *L. (L.) infantum* and 74 in *L. (L.) amazonensis*. These proteins are associated with distinct processes and functions. Regulation of nitric oxide mediated signal transduction and cell communication were related only to *L. (L.) infantum* proteins while localization and ATPase activity were associated only for *L. (L.) amazonensis* regulated proteins. The proteins involved in these *L. (L.) infantum* processes included gp63, a well-known virulence factor and a member of the ABC transporter superfamily represented *L. (L.) amazonensis* functions. Additionally, by using DIGE to compare spots differentially intense in infected murine macrophages, we noticed 2.4 % (29/1,185) of differentially intense spots. *Leishmania. (L.) infantum* and *L. (L.) amazonensis* induce a similar change in the host cell, once 11 spots were selected as differentially intense in each species and only seven in the control group. In the TMT approach, 5,939 *Mus musculus* proteins were identified. Amongst them, 240 and 263 differentially abundant proteins were found in *L. (L.) infantum* and *L. (L.) amazonensis* infection, respectively, while 170 proteins were commonly regulated in infection by both species. GO enrichment analysis pointed that *Leishmania* infection interferes in apoptotic mechanisms in the macrophage and induces epigenetics changes that may affect genes transcription. Moreover, down-regulation of proteins such as Pycard and Myd88 seems to influence inflammatory process in the infection by *L. (L.)*

amazonensis, while Tap1 and Erap1, up-regulated in macrophages infected with *L. (L.) infantum*, were involved in the adaptive immune response. Differentially abundant proteins identified in this study may play an important role in the biology of *Leishmania* species and in the macrophages immune response. They may also contribute for the better understanding of factors that determine the course on infection. Our results offer countless possibilities of targets investigation for vaccines, drugs and diagnosis for leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania*, plasma membrane, macrophages, proteomics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do fluxo de trabalho da obtenção das frações de membrana e análise proteômica	33
Figura 2	Curvas de crescimento de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	38
Figura 3	Número de proteínas identificadas e quantificadas em <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> e preditas como de membrana plasmática	40
Figura 4	Análise de enriquecimento de <i>Gene Ontology</i> (GO) em três categorias	42
Figura 5	Esquema do delineamento experimental para o estudo dos macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> através da técnica de DIGE	58
Figura 6	Delineamento experimental do estudo dos macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> através da técnica de TMT	62
Figura 7	Macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	66
Figura 8	Infecção de macrófagos com <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	67
Figura 9	Perfil proteico de macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i>	68
Figura 10	Perfil proteico de macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	69
Figura 11	Perfil proteico de macrófagos não infectados	70
Figura 12	Imagens tridimensionais representativas de <i>spots</i> selecionados com diferença de intensidade	71
Figura 13	<i>Spots</i> com aumento de intensidade em macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i>	73
Figura 14	<i>Spots</i> com aumento de intensidade em macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	74
Figura 15	<i>Spots</i> com aumento de intensidade em macrófagos não infectados	75
Figura 16	<i>Heatmap</i> das proteínas identificadas nos 3 grupos experimentais	77
Figura 17	<i>Volcano plot</i> e diagrama de <i>Venn</i> das proteínas reguladas	78
Figura 18	Enriquecimento de GO das proteínas reguladas e compartilhadas em M ϕ _Li e M ϕ _La	80
Figura 19	Enriquecimento de GO das proteínas reguladas em M ϕ _Li	81
Figura 20	Enriquecimento de GO das proteínas reguladas em M ϕ _La	82
Figura 21	Análise de enriquecimento de vias nas proteínas reguladas entre os grupos experimentais	84

Figura 22	Via Ciclo Celular enriquecida na análise pelo KEGG das proteínas com abundância diminuída em macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	85
Figura 23	Via de Sinalização Ras enriquecida na análise pelo KEGG das proteínas com maior abundância em macrófagos infectados com <i>L. (L.) infantum</i>	86
Figura 24	Via Fagossomo enriquecida na análise pelo KEGG das proteínas com menor abundância em macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das proteínas reguladas de <i>L. (L.) infantum</i> após enriquecimento de Processo Biológico e Função Molecular	42
Tabela 2	Distribuição das proteínas reguladas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após enriquecimento de Processo Biológico e Função Molecular	46
Tabela 3	Delineamento experimental para marcação das amostras com os fluoróforos no DIGE. Foram geradas 3 imagens para cada amostra, com um padrão interno (Cy2) em cada gel	59
Tabela 4	Delineamento experimental para marcação das amostras com TMT	63
Tabela 5	Número de <i>spots</i> diferencialmente intensos ($p \leq 0,05$ e $ratio \geq 1,5$) entre os grupos experimentais	72
Tabela 6	Proteínas identificadas nos <i>spots</i> diferencialmente intensos	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2DE	Eletroforese bidimensional
BVA	<i>Biological Variation Analysis</i>
CHAPS	3[(3cholamidopropil) dimetilamonio]2hidroxilpropanesulfonato.
CR	Receptores do complemento
DIA	<i>Differential in gel Analysis</i>
DIGE	Eletroforese Diferencial em Gel
DMEM	<i>Dulbesso's Modified Eagle's Medium</i>
DTT	Ditiotreitol
EDA	<i>Extended Data Analysis</i>
ESI	<i>Electrospray</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FWHM	<i>Full Width At Half Maximum</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HCD	<i>Higherenergy collisional dissociation</i>
HDMS	<i>High Definition Mass Spectrometer</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAA	Iodoacetamida
IEF	Isoeletrofocalização
iTRAQ	<i>Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
mRNA	RNA mensageiro
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MSP	<i>Major surface protease</i>
NNN-LIT	<i>Neal, Novy, Nicolle Liver Infusion Tryptose</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PSA	Antígeno de superfície de promastigotas
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TA	Temperatura ambiente

TEAB	Bicarbonato de trietilamônio
TFA	Ácido trifluoroacético
TMD	Domínio transmembrana
TMT	<i>Tandem Mass Tag</i>
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral.....	30
3.2	Objetivos específicos.....	30
	CAPÍTULO 1	32
1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
1.1	Delineamento experimental	33
1.2	Parasitas	33
1.3	Obtenção da fração de membrana	34
1.4	Preparação das amostras para espectrometria de massa	35
1.5	Análise 2D-LC-HDMS ^E	35
1.6	Bioinformática e análise de dados	36
2	RESULTADOS.....	38
2.1	Parasitas	38
2.2	Proteômica de fração de membrana de <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	39
3	DISCUSSÃO	500
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	CAPÍTULO 2	55
1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	566
1.1	Comitê de ética.....	56
1.2	Parasitas	56
1.3	Obtenção de macrófagos peritoneais	56
1.4	Infecção de macrófagos com <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	56
1.5	Eletroforese em Gel Diferencial (DIGE)	57
1.5.1	<i>Delineamento experimental</i>	577
1.5.2	<i>Obtenção de extrato proteico total de macrófagos infectados e não infectados</i>	58
1.5.3	<i>Eletroforese em gel diferencial (DIGE)</i>	58
1.5.4	<i>Análise dos géis</i>	60
1.5.5	<i>Tratamento dos spots</i>	61
1.5.6	<i>MALDI-TOF/TOF e análise de dados</i>	61

1.6	<i>Tandem Mass Tag (TMT)</i>	62
1.6.1	<i>Delineamento experimental</i>	62
1.6.2	<i>Obtenção de extrato proteico total de macrófagos infectados e não infectados</i>	62
1.6.3	<i>Marcação de peptídeos com TMT</i>	63
1.6.4	<i>Pré-fracionamento dos peptídeos por Cromatografia Líquida em Fase Reversa em pH alto</i>	64
1.6.5	<i>LC-MS/MS e análise de dados</i>	64
1.6.6	<i>Bioinformática e análise de dados</i>	64
2	RESULTADOS	666
2.1	Parasitas	66
2.2	Infecção de macrófagos	666
2.3	Eletroforese em Gel Diferencial (DIGE)	677
2.3.1	<i>Identificação das proteínas</i>	75
2.4	<i>Tandem Mass Tag (TMT)</i>	766
2.4.1	<i>Análise de ontologia gênica (GO) e vias do KEGG</i>	79
3	DISCUSSÃO	88
3.1	Mecanismos epigenéticos	90
3.2	Resposta imune na infecção por <i>L. (L.) infantum</i>	92
3.3	Inibição da apoptose e inflamação	93
3.4	Ciclo celular	95
3.5	Via de sinalização Ras	96
3.6	Fasossomo	98
4	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias amplamente difundidas nas regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo endêmicas em 98 países e territórios distribuídos na Europa, África, Ásia e Américas. A incidência anual é estimada em 1,6 milhões de casos e o número de óbitos se encontra entre 20.000 - 40.000 (ALVAR *et al.*, 2012). São classificadas como doenças negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e se destacam entre as principais causas de morte por doenças infecciosas no mundo (WHO, 2017). As leishmanioses caracterizam-se pela complexidade de formas clínicas e são importante problema de saúde pública em países em desenvolvimento por estarem associadas a precárias condições sociais e econômicas (KARAGIANNIS-VOULES *et al.*, 2013). Contudo, estudos recentes tratam da sua emergência na Europa e Estados Unidos (READY, 2010; BILBE, 2015).

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross 1903) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), parasitos intracelulares e digenéticos, os quais necessitam alternar entre hospedeiros vertebrados e invertebrados para completar seu ciclo evolutivo (GRIMALDI; TESH, 1993).

Durante seu ciclo de vida, *Leishmania* apresenta um estágio extracelular que ocorre no trato intestinal do hospedeiro invertebrado: fêmeas de insetos hematófagos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas). Nestes dípteros os parasitos se desenvolvem em sua forma flagelada, alongada e móvel, denominada promastigota. Já no hospedeiro vertebrado, representado por numerosas espécies de mamíferos, ocorre a diferenciação para a forma intracelular obrigatória, denominada amastigota, que é arredondada e não apresenta flagelo aparente (ASHFORD, 2000).

A transmissão do parasito ao inseto ocorre durante a ingestão de sangue no hospedeiro vertebrado infectado. Para se alimentar, o flebotomíneo utiliza suas peças bucais semelhantes a serra para romper a pele e capilares superficiais, fazendo o sangue fluir juntamente com macrófagos parasitados residentes na pele. No momento da telmofagia, estas células também são ingeridas e, uma vez rompidas no trato intestinal do inseto, liberam as amastigotas. Todo o conteúdo ingerido é envolto por uma matriz peritrófica secretada pelo epitélio intestinal do díptero e, estimuladas pela queda na temperatura e aumento do pH, as amastigotas se modificam em promastigotas procíclicas. Tais formas extracelulares são flageladas, pouco móveis, alongadas e se multiplicam por divisão binária. Após esta etapa de desenvolvimento, as

promastigotas migram para a válvula do estomodeu, onde se diferenciam em metacíclicas, as formas altamente móveis e infectantes (BATES; ROGERS, 2004; BATES, 2007). Recentemente foi demonstrado que no flebotomíneo já infectado por *Leishmania* a ingestão de um segundo repasto de sangue não infectado desencadeia a desdiferenciação de promastigotas metacíclicas, estágio até então considerado terminalmente diferenciado dentro do vetor. Estas formas se transformam em um estágio semelhante ao leptomonado, denominado promastigota retroleptomonado. A metaciclogênese reversa ocorre após cada repasto sanguíneo subsequente, em que promastigotas de retroleptomonados se multiplicam rapidamente e se diferenciam para promastigotas metacíclicas, aumentando a infecciosidade do flebotomíneo. Esses achados colocam fontes de sangue prontamente disponíveis como um elemento crítico na transmissão e propagação de patógenos transmitidos por vetores (SERAFIM *et al.*, 2018).

O parasito é transmitido ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos infectadas. No momento da alimentação, as promastigotas metacíclicas presentes nas glândulas salivares do inseto são regurgitadas no local da picada e sofrem fagocitose pelos macrófagos residentes. No interior do vacúolo parasitóforo das células, o parasito se transforma em amastigota. Tal mudança é condicionada à formação do fagolisossomo, compartimento resultante da fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos da célula hospedeira, cujo ambiente ácido estimula a transformação e intensa multiplicação dos parasitos. Em determinado momento da infecção, a carga parasitária no interior da célula hospedeira aumenta significativamente, levando ao rompimento mecânico da mesma e, conseqüentemente, à liberação de inúmeras amastigotas no meio extracelular. Estas, por sua vez, serão internalizadas por macrófagos não infectados, dando continuidade ao ciclo (CHANG, K.; DWYER, 1976; NEUBER, 2008). Na visão de alguns autores, a liberação de amastigotas pode se dar por uma via alternativa não relacionada à lise celular em decorrência da multiplicação dos parasitos. O mecanismo de saída se baseia em um processo semelhante à exocitose, em que as amastigotas são liberadas de forma sincronizada (RITTIG; BOGDAN, 2000). Real *et al.* (2014) demonstraram que formas amastigotas são transferidas de macrófagos infectados em processo de apoptose para macrófagos vizinhos. Neste processo, o parasito carrega consigo componentes da célula de origem, como as proteínas LAMPs e Rab7, os quais são internalizados pela célula recebedora.

Embora os macrófagos sejam considerados as mais importantes células hospedeiras para *Leishmania*, o parasito já foi encontrado em outros tipos celulares. Alguns autores têm demonstrado que os neutrófilos têm importante participação no momento inicial da interação

das promastigotas com o hospedeiro, sendo as primeiras células imunes envolvidas na fagocitose do parasito (PETERS *et al.*, 2008). Uma vez no interior dos neutrófilos, *Leishmania* atrasa a apoptose destas células, cujos corpos apoptóticos contendo parasitos viáveis são posteriormente fagocitados por macrófagos, os quais, por sua vez, se tornam infectados (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003). A infecção de células não fagocíticas, como fibroblastos e células epiteliais também já foi relatada (BELLE, 1958; BOGDAN *et al.*, 2000), porém pouco se sabe a respeito dos mecanismos de invasão utilizados por *Leishmania* nestes casos. Um recente estudo sugere que a estratégia de invasão de fibroblastos por *Leishmania* se assemelha à utilizada por *Trypanosoma cruzi*, em que há envolvimento de permeabilização transiente da membrana plasmática, sinalização de cálcio, recrutamento de lisossomos para o local de entrada do parasito e exocitose lisossomal (CAVALCANTE-COSTA *et al.*, 2019).

Cerca de 31 espécies de *Leishmania* estão distribuídas mundialmente e são conhecidas por parasitar grande diversidade de mamíferos, tais como roedores, canídeos, procionídeos, ungulados primitivos, marsupiais, edentados e primatas. Estão presentes em áreas tropicais e subtropicais, incluindo Américas do Norte, Central e do Sul, bem como na Bacia do Mediterrâneo, sudeste da Europa, Ásia central e sudeste, Índia, África (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Destas, 20 são patogênicas para o ser humano (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007; WHO, 2017).

São reconhecidos dois subgêneros de *Leishmania*: *Viannia* e *Leishmania*, e tal classificação considera, principalmente, o local de colonização no intestino do inseto vetor pelo parasito. No subgênero *Viannia*, restrito ao Novo Mundo, o parasito coloniza a porção posterior do intestino do flebotomíneo, enquanto no subgênero *Leishmania*, encontrado em ambos o Velho e Novo Mundo, o desenvolvimento ocorre exclusivamente nas porções média e anterior (LAINSON; SHAW, 1987).

A infecção por *Leishmania* pode culminar no desenvolvimento de doença crônica com duas formas clínicas principais, sendo elas: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). Esta última inclui, principalmente, as formas cutânea (LC), cutânea difusa (LCD), mucocutânea (LMC) e cutânea disseminada, embora a infecção permaneça assintomática em muitos casos (ANDRADE-NARVAEZ *et al.*, 2016; OSTYN *et al.*, 2011). Dentre os fatores que influenciam na definição do curso da doença, destaca-se a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e a resposta imune do hospedeiro.

No Brasil são conhecidas duas espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania*: *Leishmania (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, ambas importantes agentes etiológicos de leishmanioses e responsáveis por diferentes manifestações clínicas.

Leishmania (L.) infantum é agente etiológico da LV, forma mais grave da doença, que se caracteriza por ser uma infecção sistêmica resultante da disseminação do parasito e células infectadas pelo mesmo a partir do sítio inicial da infecção cutânea (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). A espécie foi primeiramente descrita por Nicolle (1908) quando o mesmo estudava a LV na Tunísia, região altamente endêmica para a doença, sobretudo em crianças. No mesmo ano o parasito também foi encontrado em cães e, desde então, estes tem sido implicados como importantes reservatórios para a enfermidade (NICOLLE; COMTE apud STEVERDING, 2017, p. 6).

Acredita-se que *L. (L.) infantum* foi introduzida no continente americano a partir da Europa, durante a colonização portuguesa e espanhola (MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000). A distribuição desta espécie na América Latina se estende do México à Argentina, havendo registros da doença por ela causada em ao menos 12 países (ALVAR *et al.*, 2012; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2012; SILVA, E. A. *et al.*, 2008). No Brasil, a LV era anteriormente conhecida como doença endêmica de zonas rurais, porém desde os anos 1980 tem sido observada a sua expansão para grandes centros urbanos (BRASIL, 2014). Dentre os fatores que contribuem para este crescimento estão a precariedade social e econômica, a qual expõe parte da população a más condições nutricionais, além de movimentos migratórios e ocupação desordenada de áreas preservadas, o que traz o vetor para as proximidades do peridomicílio e domicílio (GOMES *et al.*, 2016). Atualmente a LV está distribuída em 21 estados brasileiros, atingindo as cinco regiões (BRASIL, 2017). O país abriga 90% dos casos de LV reportados nas Américas e é o terceiro maior foco para a doença no mundo (BELO *et al.*, 2013).

São reconhecidas duas espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão de *L. (L.) infantum* no território brasileiro, sendo *Lutzomyia longipalpis* a principal delas. *Lutzomyia cruzi* tem sido relatada como vetor em áreas específicas do Mato Grosso do Sul (DOS SANTOS *et al.*, 1998).

Uma vez infectado com *L. (L.) infantum*, o ser humano pode apresentar amplo espectro de manifestações clínicas, variando de infecção subclínica, com um número indeterminado de assintomáticos em áreas endêmicas, a formas graves e fatais em crianças e quando há associação com deficiência nutricional e imunossupressão. Os sinais e sintomas provocados

pela LV incluem febre, perda de peso, anemia, esplenomegalia e hepatomegalia, emaciação, lenfademopatia, hiperglobulinemia, pancitopenia, dentre outros (BRASIL, 2017; GOMES *et al.*, 2016). Os cães são considerados importantes hospedeiros e fonte de infecção para o vetor no ambiente doméstico, e neles a doença é crônica e sistêmica (GONTIJO; MELO, 2004).

Como já citado, a outra espécie do subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) que ocorre no Brasil, é *L. (L.) amazonensis*. Essa espécie é amplamente reconhecida como um dos agentes causadores da forma cutânea no Brasil, sendo atribuídos a ela aproximadamente 8% dos casos humanos da doença. Além da LC, é também agente etiológico da LMC, da leishmaniose cutânea disseminada e é a única espécie causadora da LCD no país (BITTENCOURT *et al.*, 1989; CAMARA COELHO *et al.*, 2011). O parasito foi primeiramente observado na década de 1960 em lesão na cauda de um espécime do roedor *Oryzomys capito*. Constatou-se que as amastigotas eram muito maiores que as de *L. braziliensis* e, quando inoculadas na pele de hamster e camundongos, rapidamente produzidas grandes lesões semelhantes a tumores, repletas de amastigotas. Posteriormente, o mesmo parasito foi observado em lesões de pacientes do Pará que apresentavam LCD e, por ser biologicamente muito semelhante à espécie *L. mexicana*, recebeu a denominação de *Leishmania mexicana amazonensis* por Lainson e Shaw (1972). *Leishmania (L.) amazonensis* é encontrada na Bolívia, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Paraguai, Peru e Brasil, onde ocorre no Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-oeste (Goiás) e, principalmente, na bacia Amazônica (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010).

A LC é caracterizada pelo aparecimento de pápulas nos locais de inoculação das promastigotas pelo flebotomíneo infectado, as quais progridem lentamente para nódulos e então se transformam em úlceras. As lesões são exclusivamente cutâneas e podem regredir espontaneamente mesmo na ausência de tratamento, em virtude dos mecanismos adaptativos da resposta imune celular. A LMC é uma forma tardia que evolui a partir de uma lesão cutânea inicial e geralmente decorre da exacerbação da resposta imune celular do tipo I frente a antígenos do parasito, levando à destruição de tecido. Dentre os possíveis motivos para o desenvolvimento desta forma estão a demora na cicatrização da lesão primária e tratamento inicial inadequado (GONTIJO; CARVALHO, 2003). As lesões podem acometer a mucosa nasal e oral, causando deformidades permanentes, e o encontro de parasitos nas mesmas é escasso. No polo anérgico da LT encontra-se uma das formas menos comuns da doença. A leishmaniose cutânea difusa decorre da ausência de resposta imune celular efetiva contra o parasito, levando a sua proliferação no organismo e consequente disseminação da infecção. Por

este motivo, é possível encontrar grande quantidade de parasitos nas lesões nodulares não ulceradas (HANDMAN; BULLEN, 2002; GOMES *et al.*, 2003; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; BRASIL, 2010). A LT é considerada zoonose de animais silvestres que acomete o ser humano acidentalmente, porém os relatos de sua ocorrência em áreas urbanas e periurbanas tem sido crescentes (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1988; NEGRÃO; FERREIRA, 2009; PAVLI; MALTEZOU, 2010; MEMBRIVE *et al.*, 2012; CONSTANTINO *et al.*, 2014). O flebotomíneo *Lu. flaviscutellata* é o principal vetor, mas infecções ocasionais foram reportadas nas espécies *Lu. olmeca olmeca* e *Lu. reducta*. Os hospedeiros naturais deste parasito são roedores e marsupiais (LAINSON, RALPH, 2010).

Infecções tegumentares ocasionadas por *L. (L.) amazonensis* têm sido relatadas em diversos hospedeiros como roedores silvestres e sinantrópicos, cães e gatos domésticos, além do ser humano (DE SOUZA *et al.*, 2005; HOFFMANN *et al.*, 2012; CARDOSO *et al.*, 2015; CALDART *et al.*, 2017). Entretanto, muitos estudos têm descrito sua capacidade de visceralização, muitas vezes provocando os mesmos sinais clínicos da forma visceral (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2011; HOFFMANN *et al.*, 2012; SANCHES *et al.*, 2016; VALDIVIA *et al.*, 2017). Exemplos deste comportamento do parasito podem ser visualizados com os trabalhos de Barral *et al.* (1991) que mostraram a capacidade de *L. (L.) amazonensis* produzir amplo espectro de formas clínicas de leishmaniose em pacientes na Bahia, incluindo LV. Por sua vez, Aleixo *et al.* (2006) isolaram a espécie de linfonodo cervical de uma criança que apresentava sinais clássicos da doença visceral. Em se tratando da infecção em animais, Tolezano *et al.* (2007) relataram a identificação de *L. (L.) amazonensis* em cães domésticos clinicamente diagnosticados para leishmaniose visceral. Além disso, Celeste *et al.* (2017) demonstraram que, quando inoculados experimentalmente em hamsters, os parasitos desta espécie se disseminam para vários órgãos e provocam patologia similar à produzida na infecção por *L. (L.) infantum*.

Leishmania (L.) infantum e *L. (L.) amazonensis* são espécies pertencentes ao mesmo subgênero, entretanto interagem de maneiras diferentes com o hospedeiro vertebrado produzindo distintas manifestações clínicas. Tamanha variabilidade pode ser explicada, dentre outros fatores, pela interação do parasito com a célula hospedeira. As interações de *Leishmania* com o macrófago são diversas e envolvem um número de fatores de patogenicidade que permitem ao parasito utilizar o fagolisossomo para obter nutrientes, manipular vias antimicrobianas e realizar divisão celular. Parasitos do gênero *Leishmania* estão entre os poucos protozoários aptos a sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos e, para isto,

desenvolveram mecanismo de evasão do sistema imune (LIU; UZONNA, 2012; DUQUE; DESCOTEAUX, 2015).

Os macrófagos são células especializadas, cujo principal papel desempenhado é a fagocitose, processo essencial para a reciclagem de nutrientes, homeostase e defesa contra patógenos. Estas células circulam e migram entre tecidos detectando, internalizando e destruindo organismos estranhos, assim como eliminando células mortas. Além disso, podem apresentar antígenos a linfócitos T e iniciar inflamação através da liberação de citocinas que ativam outras células (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1999; DUQUE; DESCOTEAUX, 2015).

Em alguns modelos, tem sido demonstrado que após a inoculação de *Leishmania* no hospedeiro vertebrado pelo vetor, muitas promastigotas são destruídas no ambiente extracelular, mas algumas são eficientemente fagocitadas pelas primeiras células a infiltrar no local da infecção: os neutrófilos granulócitos. No interior destas células, os parasitos não são destruídos e ainda podem atrasar a morte celular programada do neutrófilo e induzir a produção de quimiocinas responsáveis por atrair macrófagos para o sítio da infecção. Uma vez recrutados, os macrófagos fagocitam os neutrófilos apoptóticos e infectados e o parasito inicia sua diferenciação e replicação. Desta maneira, os macrófagos são cruciais para o estabelecimento da infecção e persistência do parasito (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; LIU; UZONNA, 2012).

Além da via citada acima, as promastigotas de *Leishmania* podem ser diretamente internalizadas por macrófagos em um processo em que o parasito se liga à superfície da célula e estimula sua própria fagocitose (AIKAWA *et al.*, 1982). Esta ligação é mediada por interações entre receptores especializados na superfície do macrófago e ligantes complementares na membrana do parasito. As moléculas envolvidas no reconhecimento de *Leishmania* durante a fagocitose influenciam o destino intracelular destes organismos e, dentre elas, destacam-se os receptores do complemento (CR), de manose, de fibronectina e Fc γ . A interação com os receptores CR1 e CR3 é a principal via de internalização de *Leishmania*. Quando o processo é mediado por eles ocorre a inibição da explosão oxidativa, processo este em que há rápida liberação de espécies reativas de oxigênio. Desta maneira, criam-se condições favoráveis para sobrevivência do parasito no fagossomo. Em contrapartida, se a interação incluir receptores de fibronectina, ocorre inflamação que pode resultar na eliminação do parasito. Já a sinalização com receptor de manose pode ativar vias inflamatórias e fazer com que enzimas hidrolíticas cheguem de forma mais eficiente ao fagolisossomo. Por fim, a fagocitose mediada por receptores de imunoglobulinas (Fc γ) leva à eficaz ativação de NADPH oxidase no fagossomo,

resultando na geração de superóxido e, conseqüentemente, espécies reativas de oxigênio (HANDMAN; BULLEN, 2002; UENO; WILSON, 2012; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). A fagocitose é seguida por aumento de consumo de oxigênio pelos macrófagos, pois ocorrem processos de explosão respiratória e formação de radicais intermediários de oxigênio, que são importantes moléculas microbidas.

Em se tratando das proteínas de superfície de *Leishmania*, diversas foram descritas. A proteína *major surface protease* (MSP) ou gp63 tem participação na evasão do complemento pelas promastigotas, facilita a fagocitose das mesmas pelos macrófagos, interage com a matriz extracelular e permite a sobrevivência das amastigotas no interior dos fagolisossomos (HSIAO *et al.*, 2008; SACKS, D.; SHER, 2002; YAO, 2010). A proibitina está ligada em determinados pontos da superfície do flagelo de *L. donovani* através de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e mostrou ser importante na interação do parasito com a célula hospedeira, uma vez que sua super-expressão resulta em aumento de infectividade (JAIN *et al.*, 2010). O antígeno de superfície de promastigotas (PSA), que pertence a uma família de proteínas ligadas à membrana de *Leishmania* e que também são secretadas, está relacionada à resistência à lise pelo complemento (LINCOLN *et al.*, 2004; DEVAULT; BÄULS, 2008). A *kinetoplastid membrane protein11* (KMP11) é uma proteína que pode atuar como fator de virulência em *L. (L.) amazonensis*, uma vez que sua adição à cultura de macrófagos peritoneais de Balb/C foi capaz de aumentar significativamente o número de células infectadas (LACERDA *et al.*, 2012). Além disso, KMP11 é considerada potencial alvo para o desenvolvimento de vacinas contra a LV, atuando como molécula imunogênica para células B e T durante a infecção por *Leishmania* (DE MENDONÇA; CYSNE-FINKELSTEIN; MATOS, 2015).

Evidências mostram que *Leishmania* suprime e modula a resposta imune intracelular do hospedeiro através da inibição de funções celulares, incluindo produção de moléculas microbidas, apresentação de antígenos, apoptose, secreção de citocinas e quimiocinas, e alterações nas vias de sinalização na célula hospedeira. *Leishmania (L.) donovani* induz drástica redução no número de transcritos de macrófagos de Balb/C infectados *in vitro*, ao passo que eleva significativamente os níveis de MIP1 β , gene cujo produto desempenha papel primordial no recrutamento de macrófagos adicionais para o sítio da infecção, aumentando a quantidade de potenciais células hospedeiras para o parasito (BUATES; MATLASHEWSKI, 2001). Trabalhos revelam que a sobrevivência de algumas espécies de *Leishmania* está associada a modificações na expressão de proteínas pelos macrófagos.

Muitos estudos investigaram transcritos para entender a biologia de *Leishmania* e a relação parasito-hospedeiro (BUATES; MATLASHEWSKI, 2001; CHAUSSABEL *et al.*, 2003; RODRIGUEZ; CHANG; WILSON, 2004; PROBST *et al.*, 2012), mas a correlação relativamente fraca entre RNA mensageiro (RNAm) e níveis de proteína levam à conclusão de que não é possível prever a abundância de proteínas com base em dados quantitativos de RNAm. Além disso, na análise de RNA perdem-se informações relacionadas a processos que modulam a função e a atividade proteica, como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, transporte e degradação. Por este motivo, a proteômica deve ser considerada ferramenta crítica para estudos que visem melhor entender *Leishmania* e sua interação com o hospedeiro (VERAS; DE MENEZES, 2016).

O conjunto de proteínas expressas pelo genoma, célula ou tecido em um determinado momento é denominado proteoma. Além de ser bastante complexo, o proteoma é dinâmico, uma vez que se modifica sob diferentes condições, podendo se distinguir em diferentes tecidos de um único organismo (WILKINS *et al.*, 1996). O proteoma pode ser investigado através das ferramentas tecnológicas proporcionadas pela proteômica, a qual busca dar às proteínas identidade, quantidade e função. De maneira geral, as metodologias empregadas na proteômica podem ser classificadas como *bottom-up* e *top-down*. A primeira delas se refere à análise de peptídeos obtidos após digestão enzimática de misturas proteicas. Diferentemente, a abordagem *top-down* é aplicada para caracterizar proteínas intactas, o que é vantajoso para o estudo de modificações pós-traducionais e proteoformas. Entretanto, atualmente a proteômica *bottom-up* é a mais adotada, pois os peptídeos gerados são mais facilmente fracionados, ionizados, fragmentados e, portanto, identificados (BARBOSA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013).

O fracionamento dos peptídeos reduz sua complexidade, o que é condição fundamental para sua identificação por espectrometria de massa. Esta importante ferramenta tem como finalidade a identificação dos peptídeos por meio da ionização da amostra e avaliação da razão massa/carga dos íons gerados (MINDEN, 2007; BARBOSA *et al.*, 2012). A utilização da espectrometria de massa nas ciências biomédicas tem crescido drasticamente na última década. A introdução das técnicas de *ionização* por dessorção a laser assistida por matriz (em inglês, *MALDI*) e por *electrospray* (ESI) permitiram a ionização de moléculas não voláteis e de alta massa molecular, como proteínas e peptídeos, abrindo novos caminhos para a proteômica (HORVATIC *et al.*, 2016).

Para análises proteômicas, a combinação de eletroforese bidimensional (2DE) e espectrometria de massa é frequentemente utilizada (PENG; GYGI, 2001). A primeira foi

inicialmente proposta por O'Farrell (1975) e consiste na utilização de géis de poliacrilamida para separar proteínas pelo seu ponto isoelétrico em primeira dimensão, e posteriormente separá-las pela sua massa molecular na segunda dimensão. O 2DE é uma ferramenta poderosa e amplamente utilizada para análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas, apesar de apresentar limitações quanto à reprodutibilidade e sensibilidade. A superação destes problemas surgiu com o desenvolvimento da técnica de eletroforese diferencial (DIGE) apresentada por Ünlu, Morgan e Minden (1997). Esta técnica é uma modificação do gel bidimensional convencional e consiste na utilização de três diferentes corantes fluorescentes que se ligam covalentemente aos resíduos de lisina das proteínas de distintas amostras, não interferindo na migração destas durante a corrida eletroforética. Desta forma, o DIGE permite a comparação de duas ou três amostras proteicas simultaneamente em um mesmo gel de poliacrilamida, aumentando expressivamente a reprodutibilidade e sensibilidade.

Outra abordagem muito utilizada em proteômica permite a análise de amostras complexas evitando a eletroforese em géis de poliacrilamida. Na chamada proteômica *shotgun*, o extrato proteico não é pré-fracionado por gel, sendo diretamente submetido à digestão enzimática seguida de separação dos peptídeos por cromatografia líquida. Técnicas de *shotgun* têm sido desenvolvidas para quantificação absoluta e relativa de proteínas. Alguns métodos utilizam marcação de proteínas ou peptídeos por etiquetas isobáricas, como o *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification* (iTRAQ) e *Tandem Mass Tag* (TMT). Neles, misturas de peptídeos representando diferentes amostras biológicas são marcadas com diferentes formas de etiquetas que possuem a mesma massa. O grupo amino reativo da etiqueta reage com aminas primárias, localizadas na porção N-terminal dos peptídeos e na cadeia lateral dos resíduos de lisina. Durante a fragmentação do peptídeo no espectrômetro de massa, a ligação é quebrada, liberando um íon repórter, cuja intensidade representa a abundância relativa do peptídeo original. Apesar de apresentar várias vantagens, como capacidade de analisar simultaneamente até 10 grupos experimentais e aumentar a qualidade dos espectros MS/MS, aumentando assim a taxa de identificação dos peptídeos fragmentados, este método apresenta algumas limitações, tais como o alto custo dos reagentes e possível viés na quantificação de peptídeos menos intensos devido a co-fragmentação de íons com relação massa-carga muito próxima. Uma alternativa é a aplicação da quantificação livre de marcação (*label-free*), que se baseia na comparação da abundância de proteínas em múltiplas amostras sem a utilização de marcadores isobáricos. Neste caso, as amostras são analisadas individualmente no espectrômetro, motivo

pelo qual este método requer alta reprodutibilidade na preparação das amostras e demanda um tempo muito maior de instrumento, que aumenta proporcionalmente ao número de grupos experimentais e réplicas (PORTEUS *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013; HORVATIC *et al.*, 2016).

Estudos de proteoma de *Leishmania* são frequentemente realizados com os mais diversos objetivos. Por meio do DIGE, Costa *et al.* (2011) compararam proteínas diferencialmente expressas entre amastigotas e promastigotas de *L. (L.) infantum* e, associando 2DE e *Western Blot* com soros caninos, identificaram proteínas antigênicas nessa espécie. Também utilizando DIGE, Carnielli *et al.* (2014) identificaram proteínas possivelmente envolvidas na resistência ao miltefosine, enquanto Pires *et al.* (2014) investigaram proteínas diferencialmente abundantes em duas cepas de *L. (L.) infantum* e encontraram proteínas possivelmente envolvidas na virulência. Magalhães *et al.* (2014) demonstraram que cultivo de *L. (L.) amazonensis* por um longo período de tempo pode levar à perda de infectividade das promastigotas axênicas. Por meio de 2DE e MS/MS, identificaram que proteínas envolvidas com a infectividade do parasito, como triparedoxina peroxidase, metalopeptidases, HSP70 e dissulfeto isomerase, tiveram abundância progressivamente reduzida durante 150 dias de cultivo. Recentes trabalhos utilizaram *shotgun* para elucidar a biologia de *Leishmania* e sua interação com o hospedeiro. O fosfoproteoma de promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) donovani* realizado por Tsigankov *et al.* (2013) revelou proteínas com múltiplos sítios de fosforilação estágio-específica. Os autores sugerem que a fosforilação atua como etiqueta de reconhecimento de estresse, ativando respostas celulares.

Poucos trabalhos utilizando etiquetas isobáricas para análise proteômica em *Leishmania* ou sua interação com o hospedeiro foram publicados. Sardar *et al.* (2013), por exemplo, o utilizaram para avaliar o efeito individual e combinado de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na abundância de proteínas em promastigotas de *L. (L.) donovani*. Vinte por cento do proteoma predito da espécie foi detectado e a abundância de um quarto destas proteínas estava alterada após a exposição aos agentes estressantes. O estudo de quantificação proteica por iTRAQ realizado por Singh *et al.* (2015) comparou os perfis de expressão de proteínas de células de linhagem monocítica humana infectadas ou não com *L. (L.) donovani* e detectou indícios de que o parasito reprograma o metabolismo celular da célula infectada. Dentre as alterações relatadas, destaca-se o aumento na abundância de proteínas envolvidas na transcrição, *splicing* de RNA, reparo e replicação do DNA.

Proteínas de membrana representam entre 20 e 30% do proteoma de todos os organismos e cerca de 40% dos alvos de drogas. São fundamentais na interação parasito-hospedeiro e em vias de regulação entre patógenos e a célula infectada, atuando como receptores, canais iônicos, moléculas de adesão celular e transporte de moléculas (LYNN; MARR; MCMASTER, 2013a). Contudo, trabalhar com tais moléculas se revela uma tarefa difícil em virtude de suas características hidrofóbicas e pouca estabilidade, o que pode justificar a escassez de estudos (CARPENTER *et al.*, 2008). Em *Leishmania*, poucos trabalhos de proteoma de membrana podem ser encontrados. Yao *et al.* (2010) realizaram uma análise proteômica de membrana plasmática de formas promastigotas de *L. (L.) infantum* na tentativa de compreender a maior virulência das formas metacíclicas. Proteínas relacionadas ao estresse, bem como de transporte de prótons e nutrientes foram exclusivamente identificadas em promastigotas na fase logarítmica de crescimento; da mesma forma, cinco fatores de virulência de *Leishmania* já bem caracterizados foram exclusivos da fração de membrana das formas infectantes. Lynn, Marr e McMaster (2013) utilizaram iTRAQ para avaliar alterações na abundância de proteínas da fração de membrana de formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) mexicana*. Algumas centenas de proteínas foram identificadas em cada espécie, incluindo alguns fatores de virulência como eEF-1 α , amastina e GP63. Brotherton *et al.* (2012) investigaram o proteoma de membrana de *L. (L.) infantum* com o objetivo de contribuir para a elucidação do sistema biológico destes parasitos, bem como de sua relação com o hospedeiro. Foram identificadas 194 e 66 proteínas com ao menos um domínio transmembrana em formas promastigotas e amastigotas, respectivamente. A proteína transportadora de glicose *Imgt2* foi detectada nas promastigotas, o que é consistente com o aumento do consumo desta fonte de energia por estas formas quando comparadas às amastigotas. Além disso, foram observadas diferenças em proteínas envolvidas com a proteólise, sugerindo que os processos de degradação de proteínas ocorrem por diferentes mecanismos entre os dois estágios evolutivos. No proteoma de membrana de promastigotas de *L. (L.) donovani* realizado por Kumar *et al.* (2015), diversas proteínas de membranas identificadas já foram descritas como alvos para drogas e vacinas. Os autores destacaram o encontro da proteína transportadora de cassetes de ligação de ATP, conhecida pelo envolvimento na resistência contra drogas em protozoários parasitos.

Em se tratando de estudos de proteômica em macrófagos infectados com *Leishmania*, Menezes *et al.* (2013) mostraram, através de proteômica *shotgun*, que *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* modulam proteínas envolvidas no metabolismo celular durante os eventos iniciais

da interação *in vitro* com macrófagos de camundongos CBA. Segundo os autores, isto significa que, na infecção por cada uma das espécies, ocorre um agrupamento de determinadas proteínas possivelmente responsáveis pelas distintas respostas fenotípicas dos macrófagos, levando ao controle da infecção na célula parasitada por *L. (L.) major* e à sobrevivência de *L. (L.) amazonensis*. Hassani e Olivier (2013) realizaram o proteoma de exossomos liberados por macrófagos murinos não infectados, infectados com *L. (L.) mexicana* ou estimulados com lipopolissacarídeos (LPS). Quarenta e quatro proteínas foram exclusivamente encontradas nos exossomos infectados e, além disso, a proteína de superfície de *Leishmania* GP63 foi identificada neste grupo. Também foi possível notar que a infecção com o parasito e a estimulação com LPS modulam de maneira semelhante a abundância de proteínas compartilhadas por ambos os grupos nos exossomos dos macrófagos.

2 JUSTIFICATIVA

As diferentes manifestações clínicas das leishmanioses geralmente estão associadas com determinadas espécies de *Leishmania*. Estas sofreram adaptações que as permitiram se desenvolver no interior da célula hospedeira e, enquanto algumas espécies se limitam a lesões cutâneas, outras se disseminam para os órgãos internos. Exemplo disto é o que ocorre com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* que, apesar de pertencerem ao mesmo subgênero, produzem manifestações clínicas distintas nos seus hospedeiros vertebrados. *Leishmania (L.) infantum* está majoritariamente associada à leishmaniose visceral e *L. (L.) amazonensis* é comumente conhecida por causar lesões cutâneas, mas relatos de sua visceralização não são raros (BARRAL *et al.*, 1991; ALEIXO *et al.*, 2006; TOLEZANO *et al.*, 2007). Assim, em virtude de sua importância e diversidade clínico-epidemiológica, estas espécies constituem excelentes modelos para estudos de seu sistema biológico, virulência e interação com a célula hospedeira.

Quando inoculadas no organismo do mamífero, as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* devem penetrar os macrófagos, mas não são capazes de fazer isto ativamente. Assim, dependem da ação fagocítica destas células-alvo e o gatilho para que o processo ocorra é a interação entre receptores da superfície dos macrófagos e moléculas presentes na membrana do parasito. Observa-se que as proteínas se encontram frequentemente entre os fatores envolvidos na interação entre a *Leishmania* e seus hospedeiros, o que as torna poderosas candidatas ao estudo dessa relação (UENO; WILSON, 2012). Identificar proteínas de membrana e vias que podem ser cruciais na interação e patogêneses de *Leishmania*, bem como a interação parasito-hospedeiro, pode levar ao conhecimento de fatores de virulência e novos alvos terapêuticos. Técnicas proteômicas podem ser aplicadas para estes fins em diferentes espécies de *Leishmania*, o que é especialmente importante, uma vez que este organismo apresenta regulação pós-transcricional da expressão gênica. Além disso, o estudo proteômico permite identificar pequenas diferenças na abundância de proteínas e conhecer modificações pós-traducionais, as quais têm papel relevante na modulação das funções proteicas e na resposta imune na leishmaniose (YAO *et al.*, 2004; CUERVO *et al.*, 2007; JAIN *et al.*, 2010).

Os avanços na área da proteômica têm permitido a identificação e caracterização de vias, relacionadas tanto ao parasito quanto ao hospedeiro, visto que as técnicas existentes dão acesso a uma visão mais global e integrada de processos biológicos por meio do estudo de todas as proteínas e não somente de uma isoladamente (VERAS; DE MENEZES, 2016). Desta forma, o presente trabalho se propõe a estudar duas importantes espécies de *Leishmania* de uma

perspectiva proteômica, explorando aspectos individuais e também sua interação com a célula hospedeira. Assim, uma das vertentes do estudo é a realização do proteoma *shotgun* da membrana de formas promastigotas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* utilizando uma estratégia *label-free* em que se quantifica amostras separadamente, sem qualquer marcação, comparando a intensidade dos picos cromatográficos dos íons peptídicos analisados por LC-MS/MS (ZHANG *et al.*, 2013). Juntamente a isto, também foram investigadas as proteínas de macrófagos de camundongos infectados *in vitro* com estas mesmas espécies, utilizando técnicas proteômicas complementares de quantificação: DIGE e TMT. Na primeira a separação da mistura proteica complexa é realizada por eletroforese bidimensional, enquanto que na segunda o processo se dá por cromatografia líquida.

Os resultados encontrados podem apontar caminhos que auxiliem no entendimento de aspectos tais como tropismo de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, patogenia, amplitude de sinais clínicos e virulência. Compreender como este parasito é capaz de sobreviver e manipular a célula hospedeira para favorecer sua replicação e transmissão, também é de grande importância para o desenvolvimento de novas drogas ou estratégias terapêuticas contra a doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar proteínas da fração de membrana de *Leishmania (Leishmania) infantum* e de *L. (L.) amazonensis* e identificar proteínas diferencialmente abundantes em macrófagos infectados *in vitro* com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar e comparar as proteínas de fração enriquecida de membrana de formas promastigotas de *L. (L.) infantum* (MCAN/BR/2000/BH400) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8);
- b) Buscar associações das proteínas de membrana com a biologia das espécies, patogenia, virulência e interação com o hospedeiro;
- c) Determinar a abundância diferencial de proteínas de macrófagos murinos (Balb/C) infectados *in vitro* com *L. (L.) infantum* (MCAN/BR/2000/BH400) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8);
- d) Comparar e selecionar proteínas que possam auxiliar no entendimento do curso da infecção e interação entre parasito e célula hospedeira.

NOTA

Para fins didáticos, as seções “Materiais e Métodos”, “Resultados” e “Discussão” desta tese serão apresentadas em dois capítulos, sendo eles:

CAPÍTULO 1

Proteoma livre de marcação (*label free*) de fração de membrana de *Leishmania (Leishmania) infantum* e de *L. (L.) amazonensis*.

Objetivos específicos:

- a) Determinar e comparar as proteínas de fração enriquecida de membrana de formas promastigotas de *L. (L.) infantum* (MCAN/BR/2000/BH400) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8);
- b) Buscar associações das proteínas de membrana com a biologia das espécies, patogenicidade, virulência e interação com o hospedeiro.

CAPÍTULO 2

Proteoma de macrófagos infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* e com *L. (L.) amazonensis*.

Objetivos específicos:

- a) Determinar a abundância diferencial de proteínas de macrófagos murinos infectados *in vitro* com *L. (L.) infantum* (MCAN/BR/2000/BH400) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8);
- b) Comparar e selecionar proteínas que possam auxiliar no entendimento do curso da infecção e interação entre parasito e célula hospedeira.

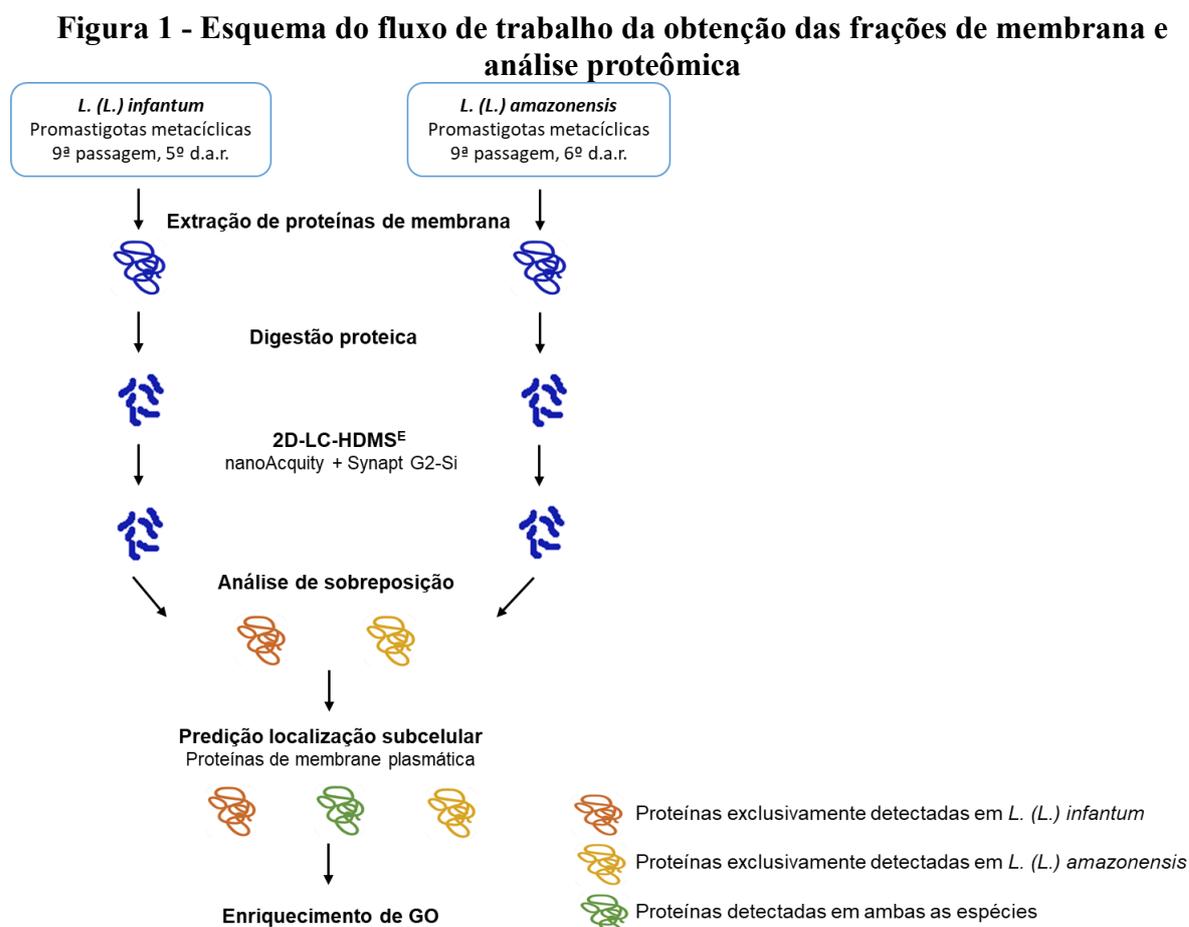
CAPÍTULO 1

Proteoma livre de marcação (*label free*) de
fração de membrana de *Leishmania (Leishmania) infantum* e
de *L. (L.) amazonensis*

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Delineamento experimental

A Figura 1 mostra o delineamento experimental para a obtenção das proteínas de membrana de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, bem como do processamento das amostras e análise dos dados.



Fonte: Elaborada pela autora.

As proteínas de membrana de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* foram obtidas das formas promastigotas metacíclicas após lise em tampão carbonato de sódio. A fração de membrana foi digerida com as enzimas Lys-C e tripsina, e os peptídeos resultantes foram submetidos à 2D-LC-HDMS^E para identificação. As proteínas identificadas foram sobrepostas e separadas conforme detectadas em ambas as espécies ou em somente uma delas. As análises de bioinformática foram realizadas para prever a localização subcelular, presença de domínio transmembrana, âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e peptídeo sinal. Proteínas de membrana plasmática exclusivamente detectadas em cada uma das espécies do estudo, assim como aquelas diferencialmente abundantes foram consideradas para as análises de enriquecimento de ontologia gênica.

d.a.r.: dia após o repique.

1.2 Parasitos

Foram utilizadas as cepas MCAN/BR/2000/BH400 e IFLA/BR/1967/PH8 de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente. Ambas são mantidas no Laboratório de Leishmanioses (Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG) sob criopreservação, bem como sob a forma promastigota em cultivo em meio acelular com repiques semanais, e em hamsters (*Mesocricetus auratus*) com repiques trimestrais.

As formas amastigotas foram isoladas do baço (*L. (L.) infantum*) e fociño (*L. (L.) amazonensis*) de hamsters infectados e transformadas em promastigotas a 23±1 °C em meio bifásico *Liver Infusion Tryptose* (NNN-LIT), suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 200U/mL e estreptomicina 100 µg/mL), pH 7,2. Após o isolamento, os parasitos foram cultivados em meio LIT. O cultivo de ambas as espécies se deu sob condições idênticas até a nona passagem, quando as formas promastigotas foram obtidas no final da fase estacionária de crescimento. A determinação deste momento se deu após realização de curva de crescimento por oito dias consecutivos. Durante este período, aspectos morfológicos também foram observados.

1.3 Obtenção da fração de membrana

Para a obtenção da fração de membrana, 10⁹ promastigotas de cada espécie (*L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*) foram coletadas no final da fase estacionária de crescimento. Os parasitos foram lavados em PBS e o precipitado final de células foi utilizado para obtenção de proteínas de membrana.

A fração proteica de membrana de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* foi obtida segundo o protocolo proposto por Melo-Braga *et al.* (2014). As formas promastigotas foram lisadas a 4°C em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 11,5, suplementado com coquetel de inibidor de proteases (*Protease Inhibitor Mix* – GE Healthcare). Os lisados foram sonicados duas vezes por 20 segundos na frequência de 40 Hz no disruptor de célula ultrassônico DES500 (Unique) e, logo após, incubados no gelo por uma hora sob agitação. As amostras foram centrifugadas a 150.000 x g por 90 minutos a 4 °C (Sorvall Ultra Pro 80 *Ultracentrifuge*) e as proteínas de membrana foram recuperadas do *pellet*. Para reduzir a contaminação com proteínas solúveis, as amostras foram lavadas duas vezes com bicarbonato de trietilamônio (TEAB) a 500 mM e 50 mM, respectivamente. Finalmente, as proteínas de membrana foram ressuspendidas

em tampão de ureia 6 M, tiourea 2 M e TEAB 50 mM, e a concentração proteica foi determinada usando o 2D Quant Kit[®] (GE Healthcare), de acordo com instruções do fabricante.

1.4 Preparação das amostras para espectrometria de massa

A fração de membrana de três replicatas biológicas independentes (3 de *L. (L.) infantum* e 3 de *L. (L.) amazonensis*) foi submetida à redução das pontes dissulfeto com ditioneitol (DTT) 10 mM (concentração final) por 1 hora a temperatura ambiente (TA). Logo após, os grupos tióis localizados nas cadeias laterais dos resíduos de cisteína foram alquilados com iodoacetamida (IAA) 40 mM (concentração final) por 1h, sob proteção da luz, também a TA. A digestão enzimática foi realizada em duas etapas. Na primeira delas, as amostras foram incubadas com endoproteinase LysC (Promega, Madison) por três horas a TA. Em seguida, as amostras foram diluídas oito vezes com TEAB 50 mM, pH 8, e foi adicionada tripsina (1:100) (Promega, Madison). A digestão trípica ocorreu por 16 horas a 37 °C e foi interrompida com a adição de ácido fórmico 1% (concentração final). O material insolúvel (lipídios) foi removido após centrifugação a 14.000 x g por 10 minutos.

As soluções com as misturas de peptídeos foram dessalinizadas e concentradas em colunas *ZipTip*®C18 (Millipore, USA) de acordo com Costa *et al.* (2011). Os peptídeos eluídos foram submetidos à secagem em centrífuga à vácuo e reconstituídos em formiato de amônio a 20 mM, pH 10.

1.5 Análise 2D-LC-HDMS^E

As replicatas biológicas independentes (n=3) de cada espécie foram submetidas à análise por espectrometria de massa de alta definição (HDMS^E). Os peptídeos foram injetados no nanoAcquity (Waters, Manchester) acoplado ao Synapt G2Si (Waters, Manchester) para análise por LC-HDMS^E.

As análises de cromatografia bidimensional por UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), no sistema nanoACQUITY UPLC 2D RP × RP, foram conduzidas utilizando duas colunas de fase reversa, sendo a primeira equilibrada em pH alcalino e a segunda, também chamada de coluna analítica, em pH ácido. Foi utilizado um gradiente (7 - 40% (v/v)) de acetonitrila (ácido fórmico 0,1% (v/v)) a 450 nL/min. O sistema UPLC foi equipado com uma coluna HSS T3 (1,8 µm 75 µm × 150 mm) (pH3) em conjunção com a

coluna RP Nano Ease XBridge BEH130 C18 (5 μm , 300 $\mu\text{m} \times 50 \text{ mm}$) (pH10). O carregamento das amostras foi de 500 ng de produto proteico digerido para cada uma das cinco frações. Todas as análises foram feitas em modo resolução com um poder mínimo de resolução de 25.000 FWHM.

Todas as análises foram realizadas com o nanoelectrospray operando em modo positivo (+) (nanoESI) e uma fonte de ionização NanoLockSpray (Waters). O espectrômetro de massa foi calibrado utilizando solução de [*Glu*¹]-Fibrinopeptide B human (*Glu-Fib*) a 100 fmol μl^{-1} . As amostras foram injetadas no Synapt G2-S HDMS e ionizadas por *electrospray*. Os dados foram adquiridos em modo HDMSE alternando-se os modos de energia padrão (3eV) e alta energia de colisão (19–55eV). O instrumento foi ajustado para que os espectros fossem efetivamente adquiridos em *m/z* entre 400-2000.

1.6 Bioinformática e análise de dados

Os dados brutos de MS gerados foram submetidos ao *software* ProteinLynx Global Server (PLGS) v.3.0.2 (Waters) e processados no Progenesis QI for Proteomics (QIP) 2.0 (Nonlinear Dynamics, UK). A busca dos dados de MS/MS foi feita contra os bancos de dados de *L. (L.) infantum* (8.237 entradas) e *L. (L.) mexicana* (8.426 entradas) obtidos no TryTripDB 35. Uma vez que o banco de dados de *L. (L.) amazonensis* estava incompleto no momento da realização das análises, a identificação das proteínas desta espécie foi feita com base no banco de *L. (L.) mexicana*. Os seguintes parâmetros foram utilizados nas buscas: um sítio de clivagem de tripsina perdido, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável, tolerância de massa de peptídeos e fragmentos de 10 ppm e 20 ppm, respectivamente.

As buscas nos bancos de dados foram realizadas em um banco reverso (*decoy*) para avaliação estatística da taxa de FDR (do inglês, *false discovery rate*). A identificação das proteínas foi validada somente quando as mesmas apresentaram confiança maior ou igual a 95% e FDR de até 1%. As proteínas foram selecionadas com base na detecção e identificação em ao menos duas das três replicatas biológicas por espécie de *Leishmania*. As proteínas diferencialmente abundantes foram consideradas e filtradas pelo teste ANOVA ($p < 0.05$).

As análises foram conduzidas de duas maneiras: qualitativa (proteína detectada ou não detectada) e quantitativa. Para a análise qualitativa, a identificação das proteínas foi feita no *software* PLGS para ambas as espécies. Somente proteínas que apareceram em ao menos duas

replicatas foram consideradas para análise. Para a análise quantitativa, o *software* Progenesis foi utilizado para avaliar a abundância relativa do proteoma de membrana de ambas as espécies e as proteínas significativamente reguladas foram filtradas pelo teste ANOVA ($p < 0,05$). Desta forma, este estudo incluiu para análise proteínas exclusivamente identificadas em uma única espécie de *Leishmania*, bem como proteínas compartilhadas pelas duas, com e sem razão de abundância.

As proteínas com diferenças qualitativas (presente ou ausente) e quantitativas ($p < 0,05$) foram classificadas como reguladas e foram submetidas a análises de bioinformática por meio de ferramentas preditivas a fim de se conhecer se pertenciam à membrana plasmática. Em tripanossomatídeos, diversas proteínas de superfície apresentam domínio transmembrana (TMD) ou estão anexadas através de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (YAO *et al.*, 2010). Deste modo, programas de bioinformática foram aplicadas para prever domínios transmembrana, âncoras de GPI, peptídeos sinal e localização subcelular nas proteínas selecionadas. Uma vez que o foco deste trabalho foi a investigação de proteínas de membrana plasmática, aquelas identificadas como localizadas no citoplasma e na membrana de organelas foram excluídas das análises subsequentes.

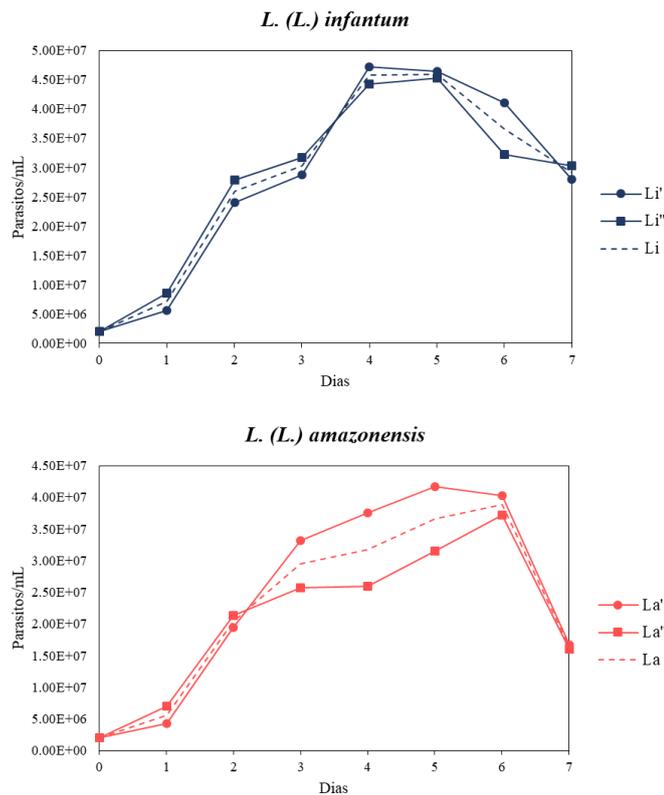
Primeiramente, as proteínas identificadas foram investigadas quanto à localização na membrana plasmática. Para isso, foi realizada a predição de localização subcelular através do programa WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) (HORTON *et al.*, 2007). Os domínios transmembrana e âncora de GPI foram preditos utilizando-se o servidor TMHMM v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (WISTRAND; SONNHAMMER, 2005) e big-PI Predictor (http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html) (EISENHABER; BORK, 1998), respectivamente. Na busca por potenciais peptídeos sinais das proteínas, o programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (PETERSEN *et al.*, 2011) v. 4.1 foi utilizado. Finalizada esta etapa, a análise de enriquecimento funcional no *Gene Ontology* (GO) foi realizada por meio do TriTrypDB 40 (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) utilizando o banco de dados de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum* como referência. Os termos de GO redundantes foram resumidos em agrupamentos pela ferramenta REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) (SUPEK *et al.*, 2011).

2 RESULTADOS

2.1 Parasitos

Foram geradas curvas de crescimento das duas espécies de *Leishmania* utilizadas neste estudo, a fim de se determinar a fase logarítmica e estacionária de crescimento. Todos os parasitos utilizados nos experimentos foram obtidos no final da fase estacionária. Os parasitos de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* foram coletados, respectivamente, no quinto e sexto dia de cultivo da nona passagem (Figura 2). Ambas as espécies apresentaram um perfil similar de crescimento *in vitro*. No decorrer dos dias de cultivo, aspectos morfológicos, tais como a diminuição do comprimento do corpo celular e o concomitante alongamento do flagelo.

Figura 2 - Curvas de crescimento de promastigotas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*



Fonte: Elaborada pela autora.

Para a construção das curvas, cada espécie foi cultivada em duplicata e cada replicata foi contada duas vezes, diariamente. A replicata 1 está representada pela linha contínua com marcador redondo, a replicata 2 pela linha contínua com marcador quadrado e a média pela linha pontilhada.

2.2 Proteômica de fração de membrana de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*

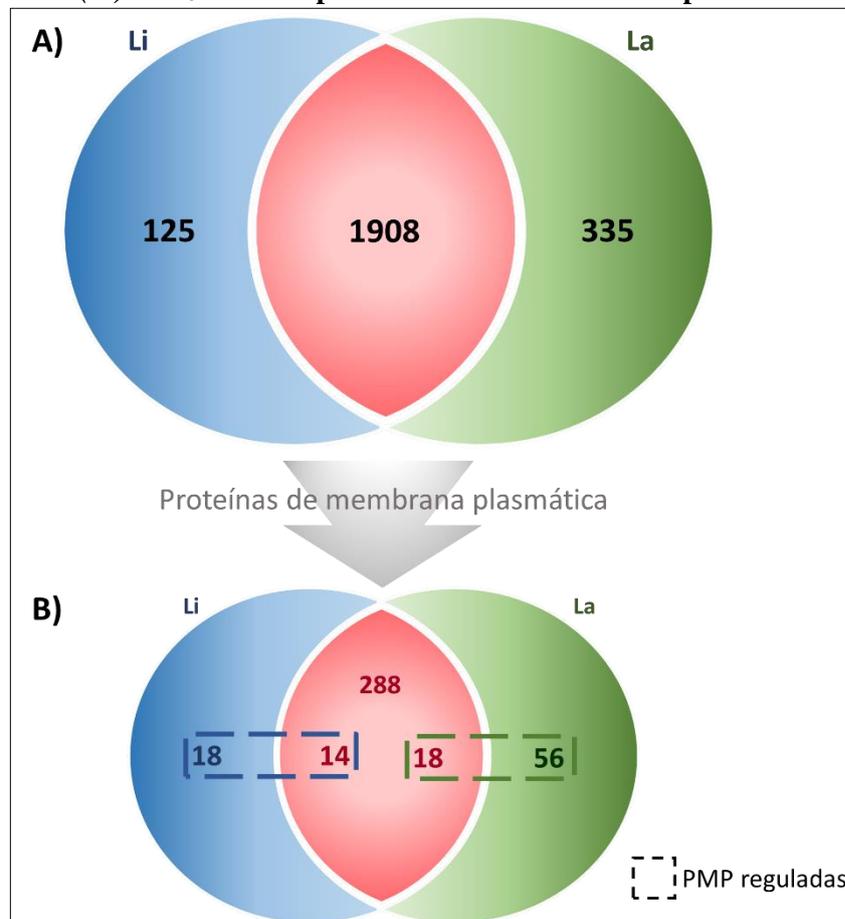
Proteínas de membrana de promastigotas metacíclicas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* foram obtidas através de lise em tampão alcalino, sonicação e ultracentrifugação para posterior análise por proteômica *label-free*. Após a extração e digestão das proteínas, os peptídeos foram analisados por meio da aplicação da metodologia 2D nanoUPLC-HDMS^E para caracterizar e quantificar o proteoma da fração de membrana dos parasitos.

Um total de 2.033 e 2.342 proteínas foram identificadas em *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente. Foi realizada a sobreposição de todas as proteínas com o intuito de se averiguar a exclusiva detecção em uma única espécie ou o compartilhamento entre elas. Como resultado, 125 proteínas não redundantes foram detectadas somente em *L. (L.) infantum*, 335 em *L. (L.) amazonensis* e 1908 proteínas quantificadas e não redundantes foram identificadas em ambas as espécies (Figura 3A).

A análise de predição de localização subcelular foi realizada com o objetivo de distinguir as proteínas de membrana plasmática. Assim, das 2.368 proteínas não redundantes identificadas neste trabalho, 394 (16,6%) foram preditas como proteínas de membrana plasmática: 18 exclusivamente detectadas em *L. (L.) infantum*, 56 em *L. (L.) amazonensis* e 320 proteínas foram compartilhadas entre as espécies. Com relação ao último grupo, somente 32 proteínas de membrana plasmática estavam diferencialmente reguladas: 14 mais abundantes em *L. (L.) infantum* e 18 em *L. (L.) amazonensis* (Figura 3B).

Assim, para as análises subsequentes, 32 proteínas de membrana foram consideradas em *L. (L.) infantum*, 18 presentes apenas nesta espécie (análise qualitativa) e 14 reguladas (análise quantitativa, $p < 0,05$). Para *L. (L.) amazonensis*, foram consideradas 74 proteínas, sendo 56 provenientes da análise qualitativa e 18 da quantitativa (Figura 3B). Estas proteínas foram submetidas à análise de enriquecimento funcional.

Figura 3 - Número de proteínas identificadas e quantificadas em *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* e preditas como de membrana plasmática



Fonte: Elaborada pela autora.

- A) Total de proteínas exclusivamente detectadas em *L. (L.) infantum* (Li, azul), em *L. (L.) amazonensis* (La, verde), bem como proteínas quantificadas entre as duas espécies (vermelho). B) Número de proteínas de membrana plasmática exclusivas de *L. (L.) infantum* (Li, azul), de *L. (L.) amazonensis* (La, verde) e quantificadas entre as duas espécies (vermelho). O retângulo tracejado azul indica as 32 proteínas de membrana plasmática reguladas positivamente em *L. (L.) infantum* e o retângulo tracejado verde as 74 proteínas de membrana plasmática reguladas positivamente em *L. (L.) amazonensis*. PMP: proteínas de membrana plasmática.

Para melhor entender os processos biológicos dos quais as proteínas de membrana plasmática diferencialmente reguladas participam, foi realizada uma análise de enriquecimento de ontologia gênica (*Gene Ontology* - GO) no TriTrypDB com filtro para FDR menor que 0,05 no teste exato de Fisher. Sessenta e nove processos biológicos (PB), 39 funções moleculares (FM) e 32 componentes celulares (CC) foram enriquecidos usando as proteínas reguladas de *L. (L.) infantum*. Os termos redundantes foram resumidos através do programa REVIGO, que atribuiu 26 termos para PB, 12 para FM e 12 para CC. No que se refere a PB, encontraram-se entre os termos mais enriquecidos: regulação de transdução de sinal mediada por óxido nítrico,

regulação de comunicação da célula, regulação de sinalização, adesão da célula, adesão biológica, regulação de resposta a estímulo, localização e processo multiorganismo. De maneira interessante, a proteína GP63 foi a única representante destes termos, estando também presente em outros PB menos destacados. Todavia, outras proteínas se sobressaíram na análise de enriquecimento, tais como a *putative protein associated with differentiation 4* (LINF_110012300), *vacuolar protein sorting-associated protein-like protein* (LINJ_360061200) e *putative prenyl protein specific carboxyl methyltransferase* (LINF_350035600). Na análise de FM, predominam as atividades de regulador de atividade de fosfatase, regulador de função molecular e atividade de endopeptidase. Mais uma vez, estes termos são fortemente representados pela GP63, e também pela *putative serine peptidase, Clan S-, family S54* (LINF_040013500) (Figura 4A, Tabela 1).

As proteínas de membrana diferencialmente reguladas no enriquecimento de *L. (L.) amazonensis* mostraram um padrão distinto de GO. Às proteínas foram atribuídos 22 PB, 18 FM e 29 CC. Após a análise pelo REVIGO, estes números foram reduzidos para 14, 11 e 17, respectivamente. Os termos não redundantes de PB mais relevantes foram localização, localização de macromolécula e transporte. As proteínas mais significativas foram *phospholipid-transporting ATPase 1-like protein* (LmxM.13.1530), *putative CAS/CSE/importin domain protein* (LmxM.29.3390), *putative phosphate transport (Pho88)* (LmxM.39.1920) e uma proteína hipotética conservada (LmxM.23.1750). O enriquecimento de função molecular revelou predominância de proteínas envolvidas em atividade de ATPase, ligação de enzima e ligação de GTPase. Membros da família *ATP-binding cassette* (LmxM.11.1220, LmxM.11.1270, LmxM.11.1290, LmxM.27.0980), além da *phospholipid-transporting ATPase 1-like protein* (LmxM.13.1530) e *putative Sec7 domain containing protein* (LmxM.07.0120) encontram-se entre as proteínas em destaque (Figura 4B, Tabela 2).

Ambas as espécies compartilharam os termos de enriquecimento de componente celular mais significativos, os quais incluíram membrana, parte da membrana, componente integral da membrana e componente intrínseco da membrana (Figura 4C), indicando que os critérios de análise de dados utilizados de fato enriqueceram proteínas relacionadas à membrana.

Um grupo de proteínas identificadas foi composto de proteínas hipotéticas e algumas delas apresentavam-se reguladas. Três proteínas hipotéticas reguladas em *L. (L.) infantum* mostraram um aumento significativo nos níveis de abundância, enquanto nove proteínas hipotéticas de *L. (L.) amazonensis* estavam aumentadas nesta espécie. A maioria destas proteínas não pôde ser classificada em nenhuma categoria de GO.

Tabela 1 - Distribuição das proteínas reguladas de *L. (L.) infantum* após análise de enriquecimento de Processo Biológico e Função Molecular

Nº de Acesso	Anotação funcional ^a	TMD ^b	SP ^c	Âncora de GPI ^d
PROCESSO BIOLÓGICO				
Regulação de transdução de sinal mediada por óxido nítrico				
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
Regulação de comunicação celular				
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
Regulação de sinalização				
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
Adesão celular				
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
Adesão biológica				
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
Regulação de resposta a estímulo				
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
Localização				
LINF_110012300	<i>protein associated with differentiation 4, putative</i>	13	-	-
LINF_230025800	<i>V-type proton ATPase subunit a, putative</i>	6	-	-
LINF_250012500	<i>SCAMP family - putative</i>	4	-	-
LINF_280025200	<i>palmitoyl acyltransferase 4 - putative</i>	4	-	-
LINF_300039600	<i>CAS/CSE/importin domain protein - putative</i>	-	-	-
LINF_320014800	<i>vacuolar proton-ATPase-like protein - putative</i>	6	-	-
LINF_360061200	<i>vacuolar protein sorting-associated protein-like protein</i>			
LINF_360072900	<i>glucose transporter 2</i>	12	-	-
Processo multiorganismo				
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
Energy coupled proton transmembrane transport, against electrochemical gradient				
LINF_230025800	<i>V-type proton ATPase subunit a, putative</i>	6	-	-
LINF_320014800	<i>vacuolar proton-ATPase-like protein - putative</i>	6	-	-
Metilação da porção C-terminal de proteína				
LINF_350035600	<i>prenyl protein specific carboxyl methyltransferase - putative</i>	4	-	-
Montagem complexa de ATP sintase transportadora de prótons				

Nº de Acesso	Anotação funcional ^a	TMD ^b	SP ^c	Âncora de GPI ^d
LINF_180008500	<i>ATP12 chaperone protein - putative</i>	0	-	-
Transporte de endossomo através de via de corpos multivesiculares				
LINF_360061200	<i>vacuolar protein sorting-associated protein-like protein</i>	0	-	-
Modificação pós-traducional de proteína				
LINF_350035600	<i>prenyl protein specific carboxyl methyltransferase - putative</i>	4	-	-
Via de corpos multivesiculares				
LINF_360061200	<i>vacuolar protein sorting-associated protein-like protein,</i>	0	-	-
Transporte de substância orgânica				
LINF_110012300	<i>protein associated with differentiation 4, putative</i>	13	-	-
LINF_250012500	<i>SCAMP family - putative</i>	4	-	-
LINF_300039600	<i>CAS/CSE/importin domain protein - putative</i>	-	-	-
Transporte de endossomo				
LINF_360061200	<i>vacuolar protein sorting-associated protein-like protein,</i>	0	-	-
Transporte de citrato				
LINF_110012300	<i>protein associated with differentiation 4, putative</i>	13	-	-
Transporte de antibiótico				
LINF_110012300	<i>protein associated with differentiation 4, putative</i>	13	-	-
Processo biológico				
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
LINF_110012300	<i>protein associated with differentiation 4, putative</i>	13	-	-
Fissão do peroxissomo				
LINF_350042300	<i>Peroxisomal biogenesis factor 11 (PEX11) - putative</i>	0	-	-
Regulação biológica				
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
LINF_110012300	<i>protein associated with differentiation 4, putative</i>	13	-	-
Alquilação de proteína				
LINF_350035600	<i>prenyl protein specific carboxyl methyltransferase - putative</i>	4	-	-
Proteólise				
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
Resposta a estímulo de temperatura				
LINF_110012300	<i>protein associated with differentiation 4, putative</i>	13	-	-
Transporte de peptídeo				

Nº de Acesso	Anotação funcional ^a	TMD ^b	SP ^c	Âncora de GPI ^d
LINF_250012500	<i>SCAMP family - putative</i>	4	-	-
LINF_300039600	<i>CAS/CSE/importin domain protein - putative</i>	-	-	-
Transporte mediado por vesícula				
LINF_280025200	<i>palmitoyl acyltransferase 4 - putative</i>	4	-	-
LINF_360061200	<i>vacuolar protein sorting-associated protein-like protein</i>	0	-	-
FUNÇÃO MOLECULAR				
Atividade de regulador de fosfatase				
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
Regulador de função molecular				
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
Atividade de endopeptidase				
LINF_040013500	<i>serine peptidase, Clan S-, family S54, putative</i>	4	-	-
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
Atividade de peptidase				
LINF_040013500	<i>serine peptidase, Clan S-, family S54, putative</i>	4	-	-
LINF_100010100	<i>GP63, leishmanolysin (+3)</i>	1	-	X
Atividade de carboxil O-metiltransferase				
LINF_350035600	<i>prenyl protein specific carboxyl methyltransferase - putative</i>	4	-	-
Atividade de transportador de cátion inorgânico monovalente transmembrana				
LINF_230025800	<i>V-type proton ATPase subunit a, putative</i>	6	-	-
LINF_320014800	<i>vacuolar proton-ATPase-like protein - putative</i>	6	-	-
Ligação a Ras GTPase				
LINF_300039600	<i>CAS/CSE/importin domain protein - putative</i>	-	-	-
Atividade de UDP-glicosiltransferase				
LINF_080006500	<i>GPI-GlcNAc transferase complex, PIG-H component, putative</i>	3	-	-
Atividade de transportador				
LINF_230025800	<i>V-type proton ATPase subunit a, putative</i>	6	-	-
LINF_320014800	<i>vacuolar proton-ATPase-like protein - putative</i>	6	-	-
LINF_360072900	<i>glucose transporter 2</i>	12	-	-
Ligação a FAD				
LINF_060018400	<i>FAD binding domain containing protein, putative</i>	0	-	-
Atividade de serina hidrolase				

Nº de Acesso	Anotação funcional ^a	TMD ^b	SP ^c	Âncora de GPI ^d
LINF_040013500	<i>serine peptidase, Clan S-, family S54, putative</i>	4	-	-
Atividade de transportador transmembrana de absorção de soluto inorgânico				
LINF_230025800	<i>V-type proton ATPase subunit a, putative</i>	6	-	-
LINF_320014800	<i>vacuolar proton-ATPase-like protein - putative</i>	6	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

TMD: domínio transmembrana; SP: peptídeo sinal. ^a Números em parênteses indicam o número de proteínas com identificação ambígua; ^b TMDs foram preditos usando TMHMM v. 2.0. ^c Peptídeos sinais foram preditos no SignalP. ^d Âncoras de GPI foram preditas usando o big-PI.

Tabela 2 - Distribuição das proteínas reguladas de *L. (L.) amazonensis* após enriquecimento de Processo Biológico e Função Molecular

Nº de Acesso	Anotação funcional ^a	TMD ^b	SP ^c	Âncora de GPI ^d
PROCESSO BIOLÓGICO				
Localização				
LmxM.13.1530	<i>phospholipid-transporting ATPase 1-like protein</i>	9	-	-
LmxM.21.0080	<i>major facilitator superfamily, putative</i>	12	-	-
LmxM.23.0830	<i>Na/H antiporter-like protein</i>	12	-	-
LmxM.23.1750	<i>hypothetical protein, conserved</i>	1	-	-
LmxM.25.0060	<i>Got1/Sft2-like family, putative</i>	4	-	-
LmxM.26.1020	<i>Inner arm dynein 5-1</i>	-	-	-
LmxM.29.3390	<i>CAS/CSE/importin domain protein, putative</i>	-	-	-
LmxM.29.3660	<i>V-type ATPase, C subunit, putative</i>	5	-	-
LmxM.32.1920	<i>Phosphate transport (Pho88), putative</i>	2	-	-
Localização de macromolécula				
LmxM.13.1530	<i>phospholipid-transporting ATPase 1-like protein</i>	9	-	-
LmxM.23.1750	<i>hypothetical protein, conserved</i>	1	-	-
LmxM.29.3390	<i>CAS/CSE/importin domain protein, putative</i>	-	-	-
LmxM.32.1920	<i>Phosphate transport (Pho88), putative</i>	2	-	-
Transporte				
LmxM.13.1530	<i>phospholipid-transporting ATPase 1-like protein</i>	9	-	-
LmxM.21.0080	<i>major facilitator superfamily, putative</i>	12	-	-
LmxM.23.0830	<i>Na/H antiporter-like protein</i>	12	-	-
LmxM.23.1750	<i>hypothetical protein, conserved</i>	1	-	-

Nº de Acesso	Anotação funcional ^a	TMD ^b	SP ^c	Âncora de GPI ^d
LmxM.25.0060	<i>Got1/Sft2-like family, putative</i>	4	-	-
LmxM.29.3390	<i>CAS/CSE/importin domain protein, putative</i>	-	-	-
LmxM.29.3660	<i>V-type ATPase, C subunit, putative</i>	5	-	-
LmxM.32.1920	<i>Phosphate transport (Pho88), putative</i>	2	-	-
Processo biossintético de peptídeo não ribossomal				
LmxM.18.1660	<i>gamma-glutamylcysteine synthetase, putative</i>	-	-	-
Processo biossintético de glutationa				
LmxM.18.1660	<i>gamma-glutamylcysteine synthetase, putative</i>	-	-	-
Transporte de substância orgânica				
LmxM.13.1530	<i>phospholipid-transporting ATPase 1-like protein</i>	9	-	-
LmxM.23.1750	<i>hypothetical protein, conserved</i>	1	-	-
LmxM.29.3390	<i>CAS/CSE/importin domain protein, putative</i>	-	-	-
LmxM.32.1920	<i>Phosphate transport (Pho88), putative</i>	2	-	-
Transporte de proteína intracelular				
LmxM.23.1750	<i>hypothetical protein, conserved</i>	1	-	-
LmxM.29.3390	<i>CAS/CSE/importin domain protein, putative</i>	-	-	-
LmxM.32.1920	<i>Phosphate transport (Pho88), putative</i>	2	-	-
Processo catabólico de regulação de proteína				
LmxM.27.1460	<i>proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 3, putative</i>	-	-	-
Processamento de peptídeo sinal				
LmxM.25.2320	<i>Microsomal signal peptidase 12 kDa subunit (SPC12), putative</i>	1	-	-
Transporte de éster organofosforado				
LmxM.13.1530	<i>phospholipid-transporting ATPase 1-like protein</i>	9	-	-
Transporte de fosfolípido				
LmxM.13.1530	<i>phospholipid-transporting ATPase 1-like protein</i>	9	-	-
Regulação de transdução de sinal de proteína Ras				
LmxM.07.0120	<i>Sec7 domain containing protein, putative</i>	-	-	-
Processo biossintético de coenzima A				
LmxM.13.1530	<i>phospholipid-transporting ATPase 1-like protein</i>	9	-	-
Processo metabólico de glutationa				
LmxM.18.1660	<i>gamma-glutamylcysteine synthetase, putative</i>	-	-	-
FUNÇÃO MOLECULAR				
Atividade de ATPase				

Nº de Acesso	Anotação funcional ^a	TMD ^b	SP ^c	Âncora de GPI ^d
LmxM.09.0230	<i>ATP-dependent protease ATPase subunit HslU2</i>	-	Y	-
LmxM.11.1220	<i>ATP-binding cassette protein subfamily A, member 2, putative</i>	15	-	-
LmxM.11.1270	<i>ABC transporter, putative (+2)</i>	14	-	-
LmxM.13.1530	<i>phospholipid-transporting ATPase 1-like protein</i>	9	-	-
LmxM.27.0980	<i>ATP-binding cassette protein subfamily A, member 9, putative</i>	7	-	-
Ligação de enzima				
LmxM.07.0120	<i>Sec7 domain containing protein, putative</i>	-	-	-
LmxM.24.2290	<i>cullin-like protein-like protein</i>	-	-	-
LmxM.29.3390	<i>CAS/CSE/importin domain protein, putative</i>	-	-	-
Ligação de GTPase				
LmxM.07.0120	<i>Sec7 domain containing protein, putative</i>	-	-	-
LmxM.29.3390	<i>CAS/CSE/importin domain protein, putative</i>	-	-	-
Atividade de ligase glutamato-cisteína				
LmxM.18.1660	<i>Gamma-glutamylcysteine synthetase, putative</i>	-	-	-
Atividade de não carregador de soluto:próton				
LmxM.23.0830	<i>Na/H antiporter-like protein</i>	12	-	-
Atividade de quinase defosfo-coA				
LmxM.13.1530	<i>phospholipid-transporting ATPase 1-like protein</i>	9	-	-
Atividade de hidrolase, atuando em anidridos ácidos				
LmxM.09.0230	<i>ATP-dependent protease ATPase subunit HslU2</i>	-	Y	-
LmxM.11.1220	<i>ATP-binding cassette protein subfamily A, member 2, putative</i>	15	-	-
LmxM.11.1270	<i>ABC transporter, putative (+2)</i>	14	-	-
LmxM.13.1530	<i>phospholipid-transporting ATPase 1-like protein</i>	9	-	-
LmxM.26.1020	<i>Inner arm dynein 5-1</i>	-	-	-
LmxM.27.0980	<i>ATP-binding cassette protein subfamily A, member 9, putative</i>	7	-	-
Atividade de 3-hidroxiacil-coA desidrogenase				
LmxM.32.2600	<i>enoyl-CoA hydratase/Enoyl-CoA isomerase/3- hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, putative</i>	-	-	-
Atividade de fator de troca de nucleotídeo de guanina associado ao fator de ribosilação de ADP				
LmxM.07.0120	<i>Sec7 domain containing protein, putative</i>	-	-	-
Atividade de ATPase de translocação de fosfolípide				
LmxM.13.1530	<i>phospholipid-transporting ATPase 1-like protein</i>	9	-	-
Regulador de função molecular				

Nº de Acesso	Anotação funcional ^a	TMD ^b	SP ^c	Âncora de GPI ^d
LmxM.07.0120	<i>Sec7 domain containing protein, putative</i>	-	-	-
LmxM.27.1460	<i>proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 3, putative</i>	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

TMD: domínio transmembrana; SP: peptídeo sinal. ^a Números em parênteses indicam o número de proteínas com identificação ambígua; ^b TMDs foram preditos usando TMHMM v. 2.0. ^c Peptídeos sinais foram preditos no SignalP. ^d Âncoras de GPI foram preditas usando o big-PI.

3 DISCUSSÃO

Embora *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* sejam espécies filogeneticamente próximas, apresentam perfis epidemiológicos distintos e são responsáveis por causar diferentes manifestações clínicas no hospedeiro vertebrado. Este cenário instigou o interesse em estudar as respectivas espécies de uma perspectiva comparativa. *Leishmania (L.) amazonensis* pode infectar grande diversidade de hospedeiros vertebrados e invertebrados (DVORAK; SHAW; VOLF, 2018; LAINSON, 2010) e causar amplo espectro de doenças em humanos, resultando em leishmaniose cutânea, mucosa, difusa e até visceral (BARRAL *et al.*, 1986; BARRAL *et al.*, 1991). Em contrapartida, *L. (L.) infantum* é capaz de infectar um número menor de hospedeiros, sejam eles vertebrados ou invertebrados, e, em humanos, está majoritariamente associada com a leishmaniose visceral (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007; LAINSON, 2010).

É importante lembrar que as promastigotas metacíclicas de *Leishmania* spp. se desenvolvem no interior do inseto vetor a partir de promastigotas procíclicas, as quais são menos infectivas e oriundas da transformação de formas amastigotas ingeridas juntamente com as células infectadas do hospedeiro mamífero. A metaciclogênese também ocorre em culturas axênicas no momento de transição da fase logarítmica de crescimento para a estacionária (SACKS, 1989). Este processo é acompanhado de alterações na morfologia do parasito, incluindo tamanho, forma e comprimento do flagelo, bem como modificações qualitativas e quantitativas na expressão de moléculas de superfície como LPG e proteínas (DA SILVA *et al.*, 2015). Portanto, para que fosse possível comparar o proteoma de membrana de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, o cultivo de ambas foi sincronizado, assegurando a utilização no mesmo estágio do ciclo evolutivo. Em virtude da similaridade entre as espécies com relação à fase de crescimento, aspectos morfológicos e infectividade de macrófagos murinos, a sincronização foi considerada bem-sucedida.

A estratégia empregada no presente trabalho para melhor compreender a diversidade biológica de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* e a interação inicial com o hospedeiro foi a investigação das proteínas de membrana plasmática de promastigotas metacíclicas. Proteínas de membrana são componentes fundamentais da membrana plasmática, uma vez que mediam processos celulares vitais. Além disso, devido a sua acessibilidade na superfície da célula, elas constituem mais de 60% dos atuais alvos para drogas (OVERINGTON; AL-LAZIKANI; HOPKINS, 2006; YAO *et al.*, 2010). Assim, a intenção deste trabalho foi a investigação do

proteoma de membrana de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, visando contribuir para o melhor conhecimento das diferenças biológicas entre as respectivas espécies.

A maioria das proteínas de membrana plasmática identificadas foram detectadas em ambas as espécies: *L. (L.) infantum* compartilhou 93% das proteínas identificadas, ao passo que *L. (L.) amazonensis* tinha 81% das proteínas em comum. Este é um resultado esperado considerando a similaridade entre os dois organismos (TSCHOEKE *et al.*, 2014). Para alcançar o propósito do estudo, entretanto, o foco foi direcionado à investigação das proteínas exclusivas de cada espécie, além daquelas diferencialmente abundantes (Figura 3).

Neste estudo, mais de 2.300 proteínas foram identificadas e 394 foram preditas como sendo de membrana plasmática. O número total de proteínas identificadas foi consideravelmente mais alto se comparado a estudos anteriores, os quais exploraram diferentes abordagens para obter e identificar proteínas de membrana de espécies de *Leishmania*. Por exemplo, Yao *et al.* (2010) identificaram 33 proteínas de membrana de promastigotas de *L. (L.) chagasi* através de LC-MS/MS utilizando extração com detergente. Um segundo estudo descreveu a identificação de 488 proteínas nas preparações de membrana de promastigotas de *L. (L.) infantum* aplicando gel 1D e MS/MS, das quais 194 tinham ao menos um domínio transmembrana (BROTHERTON *et al.*, 2012). Mais recentemente, um mapa bidimensional das proteínas de membrana enriquecidas de *L. (L.) donovani* foi gerado e 72 proteínas foram identificadas dentre os 95 *spots* detectados (KUMAR *et al.*, 2015). O primeiro proteoma quantitativo de fração de membrana de espécies de *Leishmania* foi apresentado por Lynn, Marr e McMaster (2013). Os autores usaram marcação isobárica para avaliar as proteínas diferencialmente abundantes através de um gradiente de densidade. Um total de 189 proteínas foram identificadas no extrato proteico de promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum*, enquanto 107 foram identificadas na análise de *L. (L.) mexicana*.

No perfil proteômico de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, cerca de 17% das proteínas foram preditas como de membrana plasmática, sendo a maioria delas detectadas em ambas as espécies (Figura 3B). Para reconhecer uma proteína de membrana plasmática, a maioria dos estudos de *Leishmania* consideram a presença de domínio transmembrana e/ou âncora de GPI (BROTHERTON *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2015; LYNN; MARR; MCMASTER, 2013; YAO *et al.*, 2010). De acordo com este princípio, contudo, um grande número de proteínas transmembrana de organelas e também nucleares, tais como *nucleoporin NUP65*, *putative* e *cytochrome oxidase subunit IX – putative*, foram detectadas nas análises. Por este motivo, as proteínas foram validadas como pertencentes à membrana plasmática dada

a sua predição de localização subcelular. Proteínas contaminantes não foram completamente eliminadas, mas se tornaram menos frequentes.

O número de proteínas de membrana plasmática reguladas em *L. (L.) amazonensis* foi maior (74 vs. 32), porém foi observada uma maior diversidade nas categorias enriquecidas em *L. (L.) infantum*. Ambas as espécies apresentaram um perfil de enriquecimento funcional consideravelmente distinto (Figura 4A e B). Os termos de GO “adesão celular” e “proteólise” estavam super-representados e sua detecção é de fato esperada em organismos parasitos, sendo o último um componente chave na patogenia de *Leishmania* (VALDIVIA *et al.*, 2015).

Uma notável protease de *Leishmania* se destacou entre as categorias enriquecidas: a metaloprotease GP63 (Tabela 1). Proteases são importantes fatores de virulência, sendo reconhecidas como críticas para o ciclo de vida ou patogenicidade de diversos parasitos, bem como potenciais alvos vacinais e quimioterápicos (SAJID; MCKERROW, 2002; SILVA-ALMEIDA *et al.*, 2012). A metaloprotease GP63 foi a única proteína enriquecida nas funções mais representativas referentes a processo biológico e função molecular em *L. (L.) infantum*. GP63 é um dos fatores de virulência mais estudados em *Leishmania* e a glicoproteína de superfície mais abundante nos parasitos deste gênero, especialmente nas formas promastigotas. Ela exerce diversos papéis importantes na patogenia das leishmanioses, estando implicada na resistência à lise mediada pelo complemento, facilitação da fagocitose das promastigotas metacíclicas pelo macrófago, interação com matriz extracelular e diminuição da função de células *natural killers* (CHANG; CHANG, 1986; JOSHI *et al.*, 2002; YAO, 2010). Estudos de *L. (L.) infantum* mostram que a abundância de GP63 aumenta significativamente na fase em que o parasito está se desenvolvendo da forma não infecciosa, típica da fase de crescimento logarítmica, para o estágio infectante metacíclico *in vitro* (YAO *et al.*, 2002).

Outra proteína detectada em vários termos de GO foi a provável proteína associada com diferenciação 4 (PAD4), membro da família de transportadores de carboxilato. Sua expressão é reportada na superfície de *Trypanosoma brucei*, estando envolvida na detecção de sinais para a diferenciação em tripomastigotas metacíclicas no interior do vetor (DEAN *et al.*, 2009). As funções das PADs não foram exploradas em *Leishmania*, mas um estudo recente sugere o envolvimento de uma proteína PAD na resistência de *L. (L.) donovani* a antimônios trivalentes (RASTROJO *et al.*, 2018).

Em contrapartida, grande parte dos processos biológicos e funções moleculares de *L. (L.) amazonensis* estavam relacionados a localização e atividade enzimática (Figura 4B, Tabela

2). As proteínas mais notáveis na análise de enriquecimento desta espécie são alguns membros da superfamília de proteínas transportadoras *ATP-binding cassette: putative ABC transporter, putative ATP-binding cassette protein subfamily A, member 2* (ABCA2) e *ATP-binding cassette protein subfamily A, member 9* (Tabela 2). Os transportadores ABC são responsáveis pela translocação de grande diversidade de substratos através de membranas intra e extracelulares, e são reconhecidos pelo envolvimento com resistência a drogas em protozoários parasitos (SAUVAGE *et al.*, 2009). O conhecimento sobre o papel destes transportadores na biologia, metabolismo, transmissão e infecção das leishmanioses é limitado e, por vezes, incerto. Em *Leishmania*, membros das subfamílias B, C, G e I estão envolvidos com resistência a drogas (COELHO; COTRIM, 2018). Com relação à subfamília ABCA, as proteínas identificadas ABCA2 e ABCA9 ainda não foram caracterizadas em *Leishmania*. A proteína ABCA4 está envolvida no tráfego de fosfolípidos em *Leishmania* e o aumento de sua expressão diminui a infectividade de macrófagos. Além disso, este transportador não confere resistência a drogas, incluindo alguns leishmanicidas (ARAÚJO-SANTOS *et al.*, 2005; PARODI-TALICE *et al.*, 2003). Assim, é importante investigar o papel destas proteínas não caracterizadas em espécies de *Leishmania*, uma vez que esta superfamília mostra grande importância no sucesso da infecção e sobrevivência do parasito.

Os resultados encontrados mostram um maior número de proteínas reguladas em *L. (L.) amazonensis* do que em *L. (L.) infantum*. Contudo, o oposto foi observado com relação à diversidade de categorias funcionais. Além disso, GP63 foi a única proteína representante de diversas categorias enriquecidas de *L. (L.) infantum*. Assim, estes resultados podem sugerir que *L. (L.) amazonensis* expressa maior diversidade de proteínas que exercem a mesma função, ao passo que *L. (L.) infantum* depende da GP63 para muitas funções. Isto pode estar relacionado com a maior plasticidade de *L. (L.) amazonensis* no que diz respeito à diversidade de hospedeiros (vertebrados e invertebrados), bem como de formas clínicas que se manifestam em humanos. Da mesma forma, *L. (L.) infantum* apresenta menos variações neste sentido.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da aplicação de uma análise proteômica *shotgun label-free* da fração de membrana de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, este estudo foi capaz de identificar o perfil proteico de ambas as espécies e avaliar a abundância de proteínas de membrana plasmática. A maioria das proteínas identificadas são compartilhadas, evidenciando a similaridade entre as respectivas espécies. Contudo, a análise das proteínas reguladas revelou diferenças consideráveis e indica que estas proteínas podem influenciar na biologia das espécies. Algumas das proteínas mais relevantes identificadas em *L. (L.) infantum* representam importantes fatores de virulência, atuando na interação do parasito com o hospedeiro, invasão da célula alvo do parasitismo e sobrevivência. Em *L. (L.) amazonensis* uma superfamília de proteínas transportadoras se destacou, incluindo membros associados à diminuição da infecção de macrófagos e proteínas associadas à resistência a drogas. Algumas proteínas diferencialmente abundantes eram anotadas como proteínas hipotéticas e não puderam ser caracterizadas, enquanto outras proteínas reguladas ainda não foram caracterizadas em *Leishmania* spp. A avaliação do papel destas proteínas é um passo interessante, uma vez que elas podem ser essenciais em grande diversidade dos processos biológicos e celulares destes organismos.

CAPÍTULO 2

Proteoma de macrófagos infectados com
Leishmania (Leishmania) infantum e *L. (L.) amazonensis*

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Comitê de ética

Os experimentos com camundongos foram realizados de acordo com recomendações do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo 269/2018.

1.2 Parasitos

Foram utilizadas as mesmas cepas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, isoladas e cultivadas sob as mesmas condições descritas no item 1.2 do Capítulo 1.

1.3 Obtenção de macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais de camundongos machos da linhagem Balb/C foram infectados com as espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* para avaliação das proteínas de macrófagos diferencialmente abundantes, utilizando as técnicas de DIGE e TMT. Como controle foram utilizados macrófagos não infectados.

Os macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C foram obtidos conforme protocolo de Gonçalves e Mosser (2015). O procedimento consistiu, inicialmente, na inoculação intraperitoneal de 2 mL de tioglicolato a 3% em camundongos Balb/C. Após 36 horas, os animais foram sacrificados e 10 mL de meio DMEM (Cultilab) estéril a 4 °C foram injetados na cavidade peritoneal. Após massagem abdominal, o DMEM contendo os macrófagos foi aspirado com auxílio da seringa e mantido no gelo. As células foram centrifugadas a 8.000 x g por 10 minutos a 4 °C e o precipitado foi ressuscitado em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), pH 7,4. Após contagem, 4×10^6 macrófagos/poço foram distribuídos em placas de cultura de 6 poços (Sarstedt) e incubados por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ para adesão das células. As células não aderidas foram removidas por meio de três lavagens com DMEM a TA.

1.4 Infecção de macrófagos com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*

Os macrófagos plaqueados foram infectados com 4×10^7 promastigotas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* na fase estacionária de crescimento da 9ª passagem, no 5º e 6º dia após repique, respectivamente. Após 24 horas de incubação a 37 °C, os parasitos não interiorizados foram removidos por meio de três lavagens com meio DMEM completo. As células foram incubadas e cultivadas por 72 horas, ocorrendo troca do meio de cultivo diariamente. Após este período, foi realizada a extração de proteínas totais. O grupo controle recebeu o mesmo tratamento citado, porém, no momento da infecção, foi adicionado somente DMEM completo aos poços. As infecções foram realizadas em triplicatas/grupo.

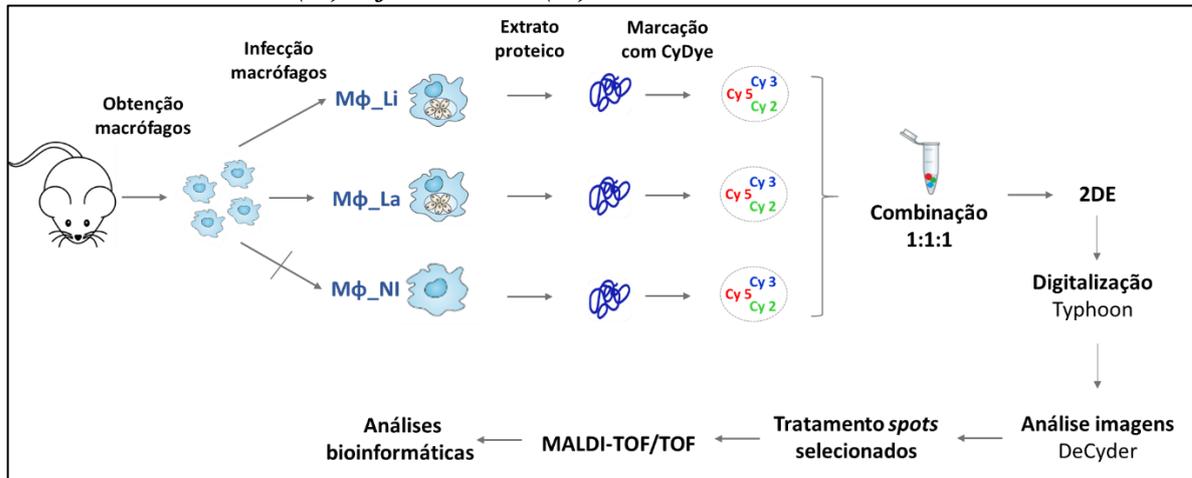
Para certificação da infecção dos macrófagos por ambas as espécies e diferenciação dos parasitos, macrófagos infectados e cultivados por 72 horas foram submetidos à fixação com metanol e coloração por Giemsa. O número de células infectadas e o número de parasitos/célula foram determinados através de contagem de 300 células/lâmina das triplicatas de cada grupo (PIRES *et al.*, 2014).

1.5 Eletroforese em Gel Diferencial (DIGE)

1.5.1 Delineamento experimental

A técnica de DIGE foi utilizada para avaliar a abundância proteica diferencial de macrófagos infectados com promastigotas metacíclicas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*. A Figura 5 mostra o delineamento experimental para este estudo.

Figura 5 - Esquema do delineamento experimental para o estudo dos macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* através da técnica de DIGE



Fonte: Elaborada pela autora.

Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C foram infectados *in vitro* com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*. O extrato proteico de cada grupo experimental foi marcado com diferentes fluoróforos e então utilizado para hidratar *strips* de 17 cm, pH 4 -7. Após eletroforese bidimensional, foi realizado o escaneamento dos géis e as imagens geradas foram analisadas. Os *spots* selecionados como diferencialmente intensos em cada grupo experimental foram excisados e tratados para extração e digestão das proteínas por tripsina. Os peptídeos resultantes foram submetidos à identificação por MALDI-TOF/TOF.

1.5.2 Obtenção de extrato proteico total de macrófagos infectados e não infectados

Os macrófagos não infectados e infectados com cada uma das espécies de *Leishmania* foram lisados com o tampão de lise (uréia 8 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, DTT 65 mM, Tris 1 M) acrescido de coquetel de inibidores de proteases (*Protease Inhibitor Mix* – GE Healthcare). As amostras foram solubilizadas e então centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante (extrato proteico) foi aliquoteado e armazenado a -80 °C até utilização. A quantificação das proteínas totais obtidas no processo de extração foi determinada utilizando o 2D Quant Kit® (GEHealthcare), de acordo com instruções do fabricante.

1.5.3 Eletroforese em gel diferencial (DIGE)

Os extratos proteicos de macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* (Mφ_Li), com *L. (L.) amazonensis* (Mφ_La) e não infectados (Mφ_NI) foram marcados com o fluoróforo CyDye™ (GE Healthcare), conforme o delineamento experimental (Tabela 3). A marcação das proteínas foi realizada de modo a ocorrer a inversão das amostras com diferentes fluoróforos (*Dye Swap* com Cy3 e Cy5) e, para normalização dos dados, uma mistura de todas as amostras foi marcada com o fluoróforo Cy2, sendo este o padrão interno. Durante todo o processo (da

marcação com fluoróforos ao escaneamento), todos os procedimentos foram realizados sob proteção da luz.

Tabela 3 - Delineamento experimental para marcação das amostras com os fluoróforos no DIGE. Foram geradas 3 imagens para cada amostra, com um padrão interno (Cy2) em cada gel

Gel	Fluoróforo/amostra		
	Cy3	Cy5	Cy2
1	Mφ_Li	Mφ_La	Mφ_Li + Mφ_La + Mφ_NI
2	Mφ_NI	Mφ_Li	Mφ_Li + Mφ_La + Mφ_NI
3	Mφ_La	Mφ_NI	Mφ_Li + Mφ_La + Mφ_NI
4	Mφ_Li	Mφ_La	Mφ_Li + Mφ_La + Mφ_NI
5	Mφ_NI	Mφ_Li	Mφ_Li + Mφ_La + Mφ_NI

Fonte: Elaborada pela autora.

Mφ_Li: macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*; Mφ_La: macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*; Mφ_NI: macrófagos não infectados.

Antes de iniciar os experimentos, o pH das amostras foi medido e, caso necessário, ajustado para 8,5 com HCl 0,5 M ou NaOH 0,5 M. As amostras foram marcadas com 400 pmol de cada fluoróforo (Cy2, Cy3 e Cy5) e mantidas no gelo por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de lisina 10 mM para interrupção da marcação das proteínas, com incubação de 10 minutos no gelo. Finalizada a etapa de marcação, foi realizada a hidratação de tiras de gel de poliacrilamida com pH imobilizado. Para isto, tampão de hidratação (uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, DTT 2%) acrescido de IPG Buffer 1% foi adicionado às amostras e estas foram incubadas sob leve agitação por cerca de 40 minutos a TA. Esta solução foi aplicada em *strips* de 17 cm, pH 4-7, do tipo *Immobilized pH Gradient* (IPG) (BioRad) por 12 horas para hidratação passiva. Posteriormente, as *strips* contendo as amostras foram submetidas à focalização isoeletrica (IEF) no equipamento Ettan™ IPGPhor™ 3 (GEHealthcare), a 50µA/strip com as seguintes condições: 500 V por 10 horas; 1000 V por 1 hora e 30 minutos; 8000 V por 2 horas; 8000 V até acumular 40000 Vh e 500 V por 1 hora.

Concluída a IEF, as *strips* foram equilibradas para redução e alquilação das proteínas. Primeiramente, elas foram incubadas em tampão de equilíbrio (50 mM de tris 1,5 M pH 8,8, ureia 6M, 30% glicerol, 2% SDS, 0,001% v/v azul de bromofenol 0,5%) contendo 10 mg/mL de DTT por 15 minutos sob leve agitação a TA. Em seguida, as *strips* foram incubadas com IAA 25 mg/mL em tampão de equilíbrio nas mesmas condições. As *strips* foram lavadas

rapidamente em tampão tris-glicina 10% e posicionadas horizontalmente na parte superior do gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12%, sendo seladas com agarose 0,5%. Foi utilizado o sistema vertical Ettan DALTsix *Electrophoresis Unit* (GE Healthcare). A corrida se deu a 100 V/gel e 50 mA/gel a 10 °C.

Finalizada a eletroforese, os géis gerados foram digitalizados no *scanner Typhoon FLA 9000* (GEHealthcare) e, posteriormente, corados por *Coomassie Brilliant Blue G250* (NEUHOFF *et al.*, 1988) para futura excisão manual dos *spots* selecionados como diferencialmente abundantes.

1.5.4 Análise dos géis

As imagens dos géis geradas no *Typhoon* foram analisadas utilizando o *software DeCyder™ 2D Differential Analysis Software v7.2* (GE Healthcare). Através do módulo *Image Loader* as imagens dos géis foram importadas para o banco de dados do *Decyder™* ficando, assim, acessíveis para os outros módulos do programa. Nessa importação, as imagens geradas de cada fluoróforo (Cy2, Cy3 e Cy5) foram agrupadas. Também foram ajustados o brilho e contraste.

Após o carregamento das imagens, fez-se a análise no módulo DIA (*Differential In Gel Analysis*), com o qual se faz uma sobreposição das três imagens de cada gel, gerando uma única. Os *spots* foram detectados e quantificados pelo DIA em uma imagem combinada derivada de uma mescla de imagens individuais, assegurando que todos os *spots* detectados estivessem representados em todas as imagens. A detecção dos *spots* foi realizada de acordo com os parâmetros escolhidos: inclinação ($\geq 0,87$), volume, área (≤ 350) e tamanho do pico. Estes valores de inclinação e área foram utilizados com a finalidade de eliminar artefatos equivocadamente detectados como *spots*, porém ainda houve a necessidade de realizar uma cuidadosa edição manual para exclusão de artefatos.

Em seguida, as imagens foram exportadas para o módulo BVA (*Biological Variation Analysis*) o qual utilizou os arquivos gerados pelo modo DIA e as imagens originais para realizar o *match* e identificar os *spots* de proteínas comuns entre os diferentes géis. Foi necessário revisar e conferir os *matches* manualmente e, após esta etapa, por meio do BVA foram realizadas análises estatísticas com *teste T student* e *OneWay ANOVA*. Todos os *spots* com $p \leq 0,05$ e *ratio* $> 1,5$ foram considerados diferencialmente intensos.

1.5.5 Tratamento dos spots

Os spots diferencialmente intensos foram excisados dos géis para a identificação por espectrometria de massa por MALDI-TOF/TOF.

Para a identificação dos spots selecionados, os mesmos foram retirados dos géis e descorados através de três lavagens de 15 minutos com 400 µL de solução de ACN 50% e bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0 sob constante agitação. Após a remoção da solução descorante, os *spots* foram desidratados com 200 µL de ACN por 5 minutos. Para a digestão proteica, foram adicionados 10 µL de tripsina (Promega, USA) a 20 ng/µL juntamente com 20 µL de bicarbonato de amônio 50 mM a cada *spot*, e as amostras foram incubadas a 37 °C por 16-24 horas para a completa digestão e fragmentação das proteínas. Posteriormente a esta etapa, a solução contendo os peptídeos de cada amostra foi transferida para novos tubos e, aos tubos anteriores, foram acrescentados 30 µL de solução de ácido fórmico 5% e ACN 50% por 30 minutos sob agitação. Este procedimento foi realizado mais uma vez para completa extração dos peptídeos. As amostras foram submetidas a centrifugação a vácuo até o volume aproximado de 10 µL para concentração dos peptídeos.

As soluções com as misturas de peptídeos foram dessalinizadas e concentradas em colunas ZipTip®C18 (Millipore, USA) de acordo com (COSTA *et al.*, 2011).

1.5.6 MALDI-TOF/TOF e análise de dados

Um volume de 0,5 µL da amostra concentrada resultante do procedimento acima descrito foi misturada com 0,5 µL 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 TA. 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 feita 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.

Os dados obtidos foram armazenados e levados para o *software Bruker Daltonics BioTools 3.2™*, em que se deu a pesquisa no banco de dados MASCOT (Matrix Science, USA

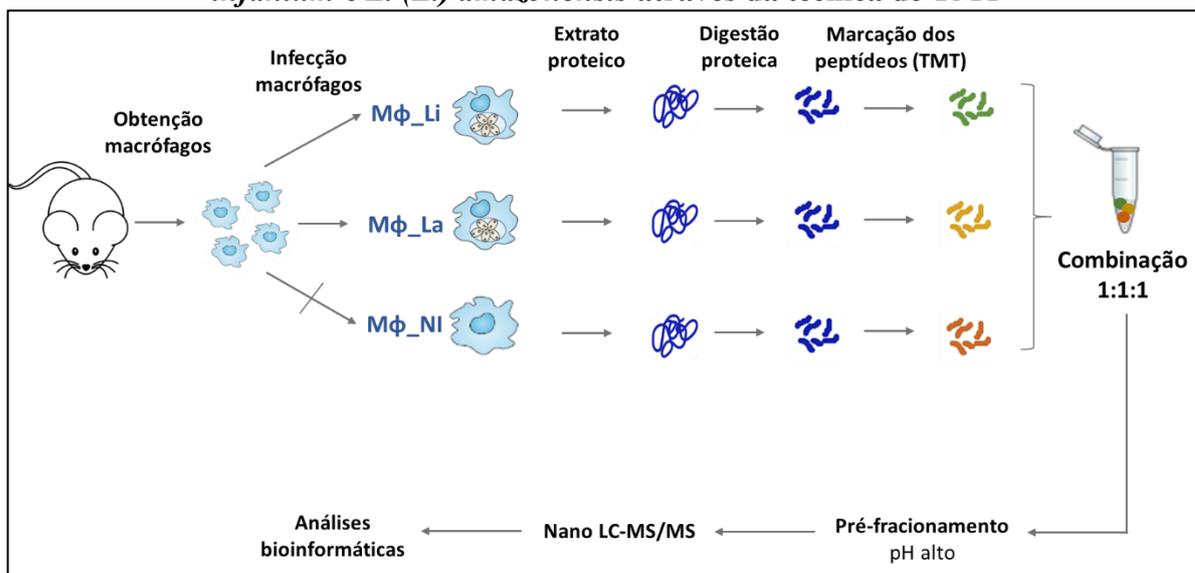
– <http://www.matrixscience.com>). Apenas proteínas com valores de *score p* ≤ 0,05 foram consideradas na identificação.

1.6 Tandem Mass Tag (TMT)

1.6.1 Delineamento experimental

A abundância proteica diferencial de macrófagos infectados com promastigotas metacíclicas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* também foi avaliada pela técnica de TMT. Neste caso, a digestão das proteínas ocorreu em solução, os peptídeos foram marcados com isóbaros e o fracionamento das amostras se deu por cromatografia líquida. A Figura 6 mostra o delineamento experimental para este estudo.

Figura 6 - Delineamento experimental do estudo dos macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* através da técnica de TMT



Fonte: Elaborada pela autora.

Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C foram infectados *in vitro* com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*. O extrato proteico de cada grupo experimental foi submetido à digestão tríplica, e os peptídeos resultantes foram marcados com *tags* isobáricas e combinados na proporção de 1:1. Anteriormente à análise por LC-MS/MS, os peptídeos foram pré-fracionados em pH alto. As proteínas identificadas foram submetidas a análises de bioinformática através do programa DAVID.

1.6.2 Obtenção de extrato proteico total de macrófagos infectados e não infectados

Para obtenção do extrato proteico para marcação com TMT, os macrófagos não infectados e infectados com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* foram lisados com tampão

de lise (TEAB 100 mM, SDS 10%). O lisado foi centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para tubos novos. A quantificação das proteínas totais obtidas no processo de extração foi determinada utilizando o 2D Quant Kit® (GEHealthcare), de acordo com instruções do fabricante.

As proteínas foram reduzidas através de incubação com *Tris (2carboxyethyl) phosphine* (TCEP) 200 mM por uma hora a 55 °C, alquiladas com IAA 375 mM por 30 minutos sob proteção da luz e precipitadas a 20 °C com adição de acetona gelada por 16 horas. As amostras foram centrifugadas e o *pellet* resultante foi ressuscitado com TEAB 100 mM. A digestão enzimática foi realizada com tripsina (Promega, Madison) por 16 horas a 37°C.

1.6.3 Marcação de peptídeos com TMT

Após a tripsinização das proteínas, os peptídeos foram marcados com isóbaros específicos, provenientes do kit *TMT® Sixplex Isobaric Mass Tagging* (Thermo Scientific). Foi utilizado para a marcação 0,4 mg de cada isóbaro (TMT6-126; TMT6-127; TMT6-128; TMT6-129; TMT6-130 e TMT6-131) em 27 µg de cada amostra, de acordo com a Tabela 4. Essa reação foi incubada por uma hora em temperatura ambiente, para a completa marcação. Após esse tempo de incubação, foi acrescentado 8 µL de hidroxilamina 5% para interromper a marcação dos isóbaros com os peptídeos e incubado por 15 minutos. Após esse tempo, as replicatas 1 e 2 foram combinadas em único tubo (A), bem como as replicatas 3 e 4 (B).

Tabela 4 - Delineamento experimental para marcação das amostras com TMT

TAG	REPLICATAS			
	A		B	
TMT126	Replicata 1	Mφ_Li	Replicata 3	Mφ_La
TMT127		Mφ_La		Mφ_NI
TMT128		Mφ_NI		Mφ_Li
TMT129	Replicata 2	Mφ_Li	Replicata 4	Mφ_NI
TMT130		Mφ_La		Mφ_Li
TMT131		Mφ_NI		Mφ_La

Fonte: Elaborada pela autora.

Mφ_Li: macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*; Mφ_La: macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*; Mφ_NI: macrófagos não infectados.

1.6.4 Pré-fracionamento dos peptídeos por Cromatografia Líquida em Fase Reversa em pH alto

Os peptídeos marcados das replicatas A e B foram ressuspensos em solvente A (formiato de amônio 20 mM pH 9,3) e fracionados utilizando uma coluna C18 Acquity UPLC MClass CSH 1.7 μm , 300 μm X 100 mm (Waters) no Ultimate 3000 HPLC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) operando a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Cada amostra foi separada em 24 frações, as quais foram combinadas em 8 frações finais e coletadas em placas de 96 poços. Ao fim do processo, a placa foi levada à centrífuga a vácuo para secagem.

1.6.5 LC-MS/MS e análise de dados

Os peptídeos marcados com TMT e pré-fracionados foram ressuspensos em ácido fórmico 0,1% e injetados no HPLC de nanofluxo EASYnLC (Thermo Scientific). Foi utilizado um sistema composto por duas colunas, sendo uma pré-coluna (coluna de sílica com 2 cm de comprimento e 100 nm de diâmetro interno, preenchida com resina C18, diâmetro das partículas igual a 5 μm) e uma coluna analítica (coluna de sílica com 17 cm de comprimento e 75 nm de diâmetro interno, preenchida com resina C18, diâmetro das partículas igual a 3 μm). O solvente A consistia em ácido fórmico 0,1% e o solvente B em acetonitrila 90% e de ácido fórmico 0,1%. O gradiente cromatográfico utilizado para separar as amostras foi (em porcentagem do solvente B): 1-7% por 3 min; 7-25% em 81 min; 25-45% em 5 min; 45-100% em 3 min, sendo o fluxo mantido em 220 nL. Os peptídeos eluídos da coluna analítica foram ionizados por *nanoelectrospray* e direcionados para o espectrômetro de massa QExactive HF Orbitrap (Thermo Fisher). Foi utilizado o modo Aquisição Dependente de Dados (do inglês, DDA). Os íons de peptídeos foram resolvidos no Orbitrap, na faixa entre 400 e 1600 m/z, com uma resolução de 120.000 FWHM. Os 20 íons mais intensos (Top 20) foram selecionados no quadrupolo, usando uma janela de isolamento igual a 1,2 m/z, para fragmentação por dissociação por colisão em alta energia (do inglês, HCD), com uma energia de colisão normalizada de 34. Os fragmentos originados foram resolvidos no Orbitrap, em uma faixa entre 110 e 2000 m/z, e com uma resolução de 60.000 FWHM.

1.6.6 Bioinformática e análise de dados

Os dados brutos foram processados no *Proteome Discoverer* 2.1 (Thermo Scientific) e a busca foi feita contra o banco de dados de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) mexicana* no TryTripDB 36 (8.237 e 8.246 entradas, respectivamente), e *Mus musculus* no UniProt (84.951 entradas). Uma vez que o banco de dados de *L. (L.) amazonensis* estava incompleto no momento da realização das análises, a identificação das proteínas desta espécie foi feita com base no banco de *L. (L.) mexicana*, espécie pertencente ao mesmo complexo de espécies de *L. (L.) amazonensis*. O servidor MASCOT foi utilizado para a realização da busca e comparação dos espectros preditos/experimentais e, por fim, identificação dos peptídeos/proteínas. Os seguintes parâmetros foram utilizados nas buscas: tolerância de massa de 10 ppm; *product ion mass tolerance* de 0.05 Da (fragmentação do tipo HCD); carbamidometilação de cisteínas, TMT6plex (K) e TMT6plex (N-term) como modificações fixas; e um sítio de clivagem de tripsina perdido. Para as análises, foram considerados somente peptídeos únicos com q value \leq 0,01, MASCOT *rank* de 1 e valor de score do MASCOT \geq 22.

O *software* DanteR foi utilizado para transformação logarítmica dos dados, normalização e realização do teste estatístico ANOVA. Com o intuito de identificar as proteínas diferencialmente abundantes, os valores de intensidade relativa das proteínas foram comparados entre os grupos de macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* (M ϕ _Li), *L. (L.) amazonensis* (M ϕ _La) e macrófagos não infectados (M ϕ _NI). Foram consideradas reguladas as proteínas com valor de $p < 0,05$.

As proteínas reguladas em cada grupo experimental foram categorizadas funcionalmente através das anotações de processos biológicos e funções moleculares catalogados de acordo com o *Gene Ontology* (GO). Para cada categoria, o teste exato de *Fischer* foi empregado para testar o enriquecimento das proteínas selecionadas utilizando como referência as 5.939 proteínas identificadas no estudo. Termos com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Com a finalidade de conhecer as vias com as quais as proteínas diferencialmente abundantes estavam envolvidas, o banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) foi utilizado para realizar a anotação. Estas análises foram realizadas por meio da ferramenta DAVID v. 6.8 (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (<https://david.ncifcrf.gov/>) (HUANG, D. W.; SHERMAN; LEMPICKI, 2009b, a).

2 RESULTADOS

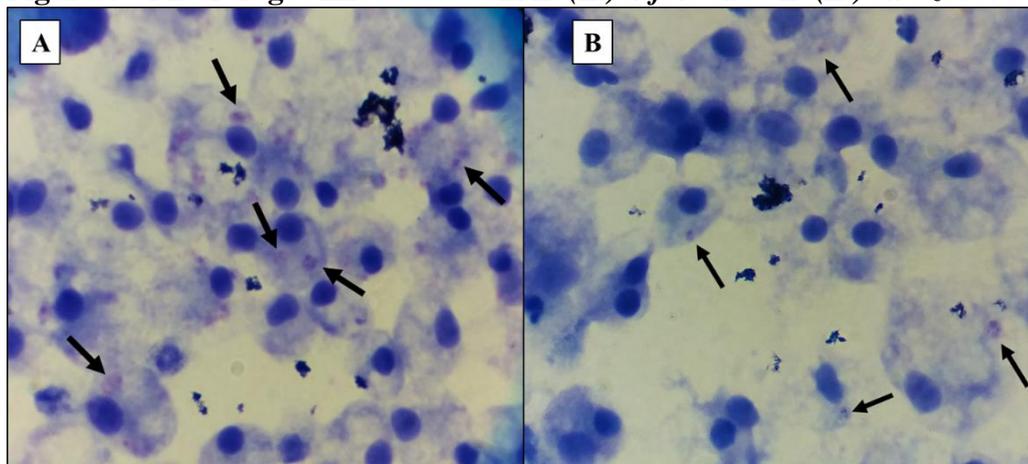
2.1 Parasitos

Ambas as cepas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* apresentaram curvas de crescimento similares, conforme descrito e ilustrado no item 2.1, Figura 2 da seção Resultados, Capítulo 1.

2.2 Infecção de macrófagos

Para investigar as proteínas envolvidas na interação da célula hospedeira com *Leishmania*, macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C foram isolados e infectados *in vitro* com promastigotas metacíclicas de *L. (L.) infantum* no 5º d.a.r e de *L. (L.) amazonensis* no 6º d.a.r. Após 72 horas de incubação, as células infectadas foram coradas e o índice de infecção foi avaliado, juntamente com o número de amastigotas por macrófagos em cada infecção. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na infecção das células pelas duas espécies (Figuras 7 e 8).

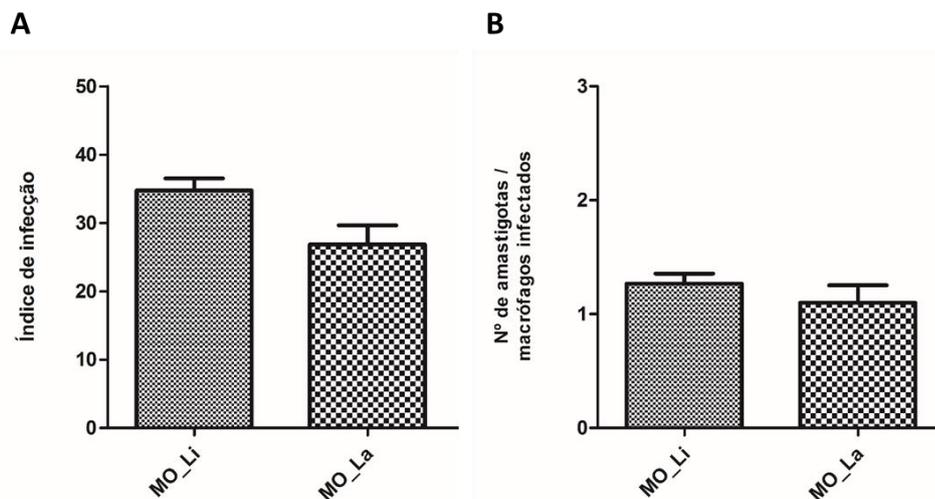
Figura 7 - Macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*



Fonte: Fotografia da autora.

Após 72 horas da infecção, é possível observar amastigotas (setas) de *L. (L.) infantum* (A) e *L. (L.) amazonensis* (B) no interior dos macrófagos peritoneais.

Figura 8 - Infecção de macrófagos com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*



Fonte: Elaborado pela autora.

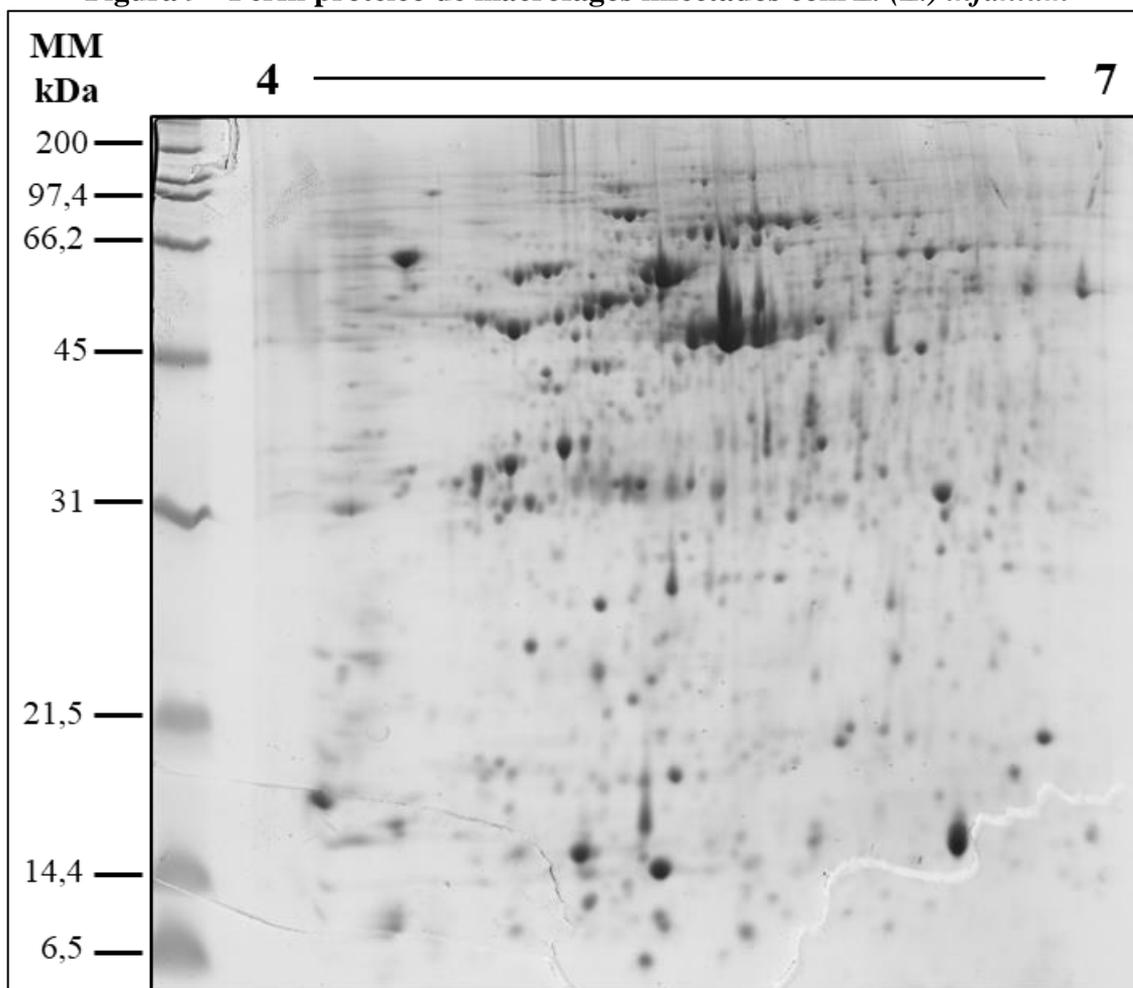
Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. (L.) infantum* (MO_Li) e *L. (L.) amazonensis* (MO_La). O índice de infecção (A) e número de parasitos/célula (B) foram determinados pela média das triplicatas.

2.3 Eletroforese em Gel Diferencial (DIGE)

Duas abordagens proteômicas foram aplicadas com a finalidade de estudar comparativamente a abundância de proteínas entre macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*: as técnicas de DIGE e TMT. Para o DIGE, foram obtidos extratos proteicos de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C infectados *in vitro* com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, bem como de macrófagos não infectados.

Antes da produção dos géis de DIGE, foram confeccionados géis 2-DE em *strips* de 18 cm, carregados com 600 µg de proteína e corados com Coomassie Brilliant Blue G-250, para obtenção do perfil proteico dos três grupos. Os resultados mostraram que os parâmetros utilizados na focalização isoeétrica e SDS-PAGE foram eficientes para separar as proteínas em ambas as dimensões (Figuras 9, 10 e 11).

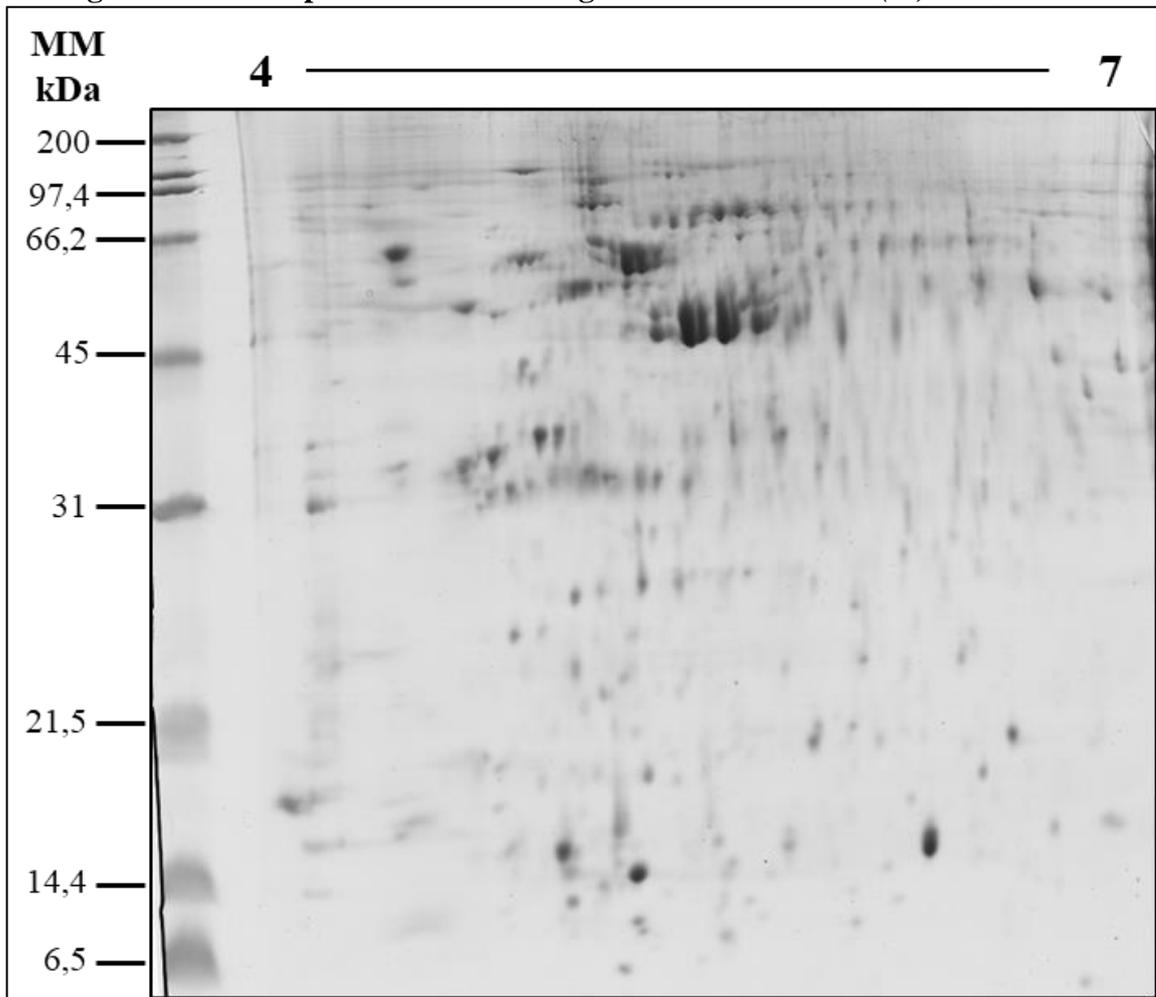
Figura 9 - Perfil proteico de macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*



Fonte: Elaborada pela autora.

Gel bidimensional confeccionado com *strip* de 17 cm, pH 4 – 7, SDS-PAGE 12%, carregado com 600 µg de proteínas de macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*, e corados por *Coomassie Brilliant Blue G250*.
MM: Massa Molecular; kDa: Quilodalton.

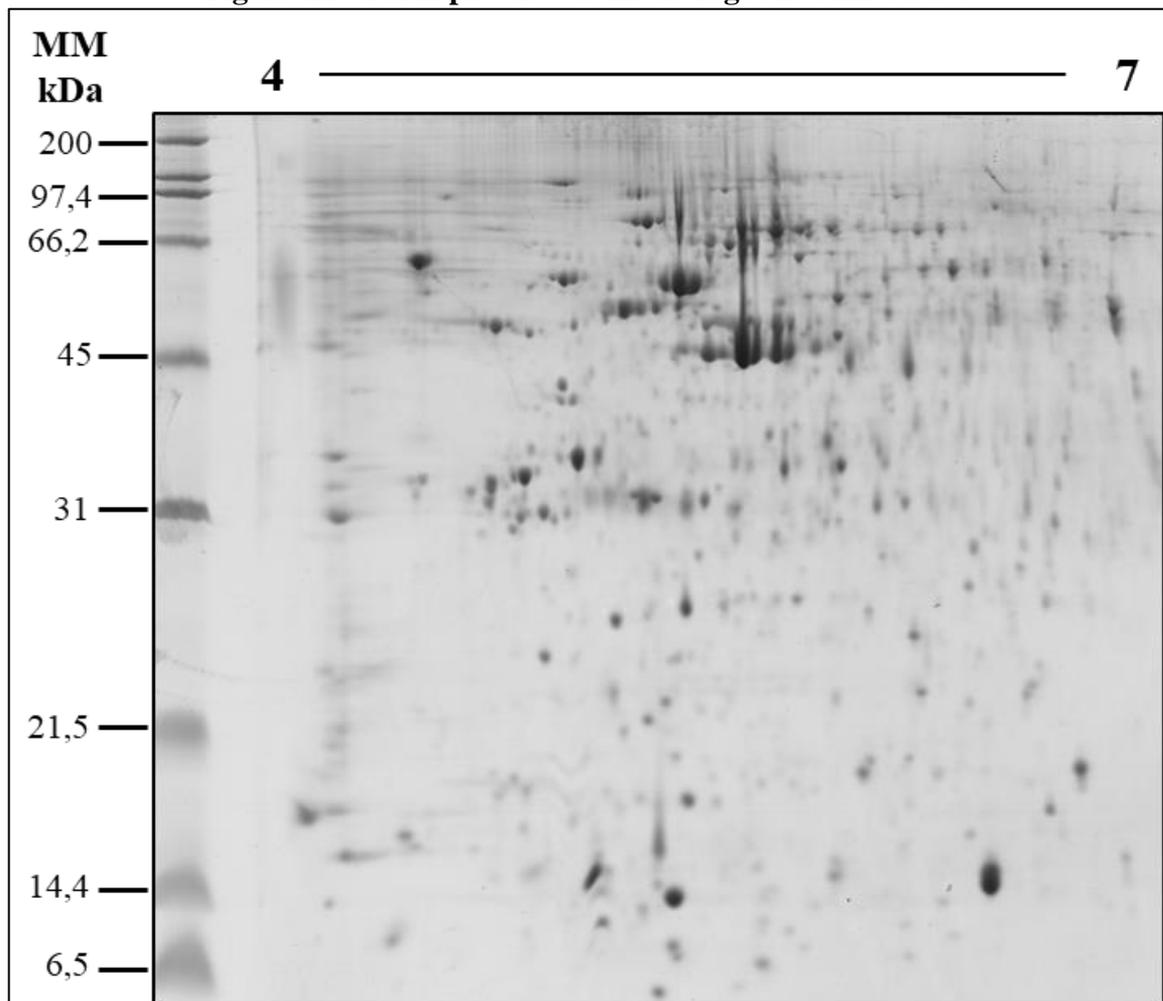
Figura 10 - Perfil proteico de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*



Fonte: Elaborada pela autora.

Gel bidimensional confeccionado com *strip* de 17 cm, pH 4 – 7, SDS-PAGE 12%, carregado com 600 µg de proteínas de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, e corados por *Coomassie Brilliant Blue G250*. MM: Massa Molecular; kDa: Quilodalton.

Figura 11 - Perfil proteico de macrófagos não infectados



Fonte: Elaborada pela autora.

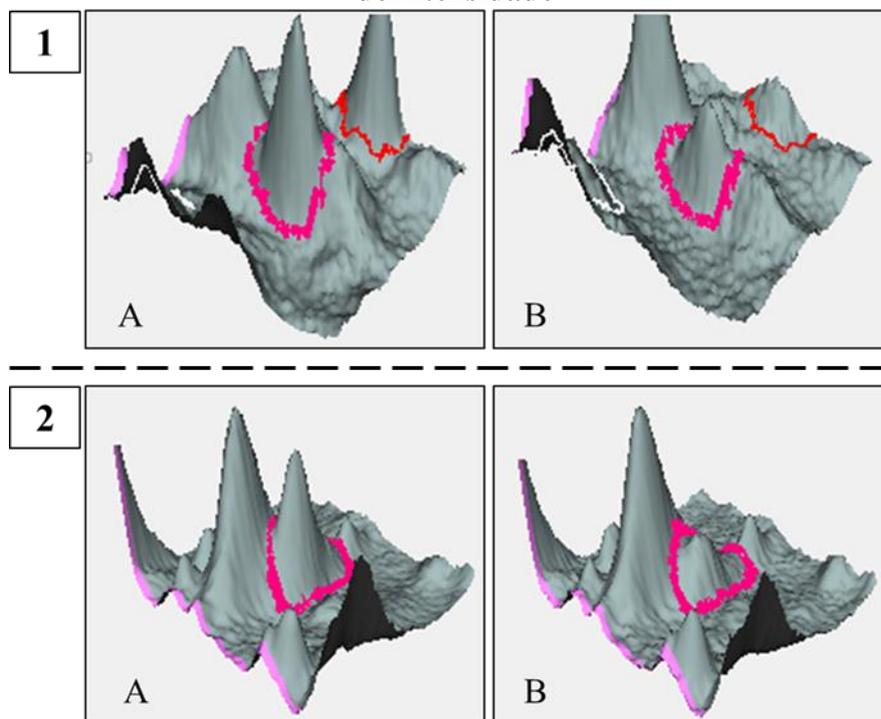
Gel bidimensional confeccionado com *strip* de 17 cm, pH 4 – 7, SDS-PAGE 12%, carregado com 600 µg de proteínas de macrófagos não infectados, e corados por *Coomassie Brilliant Blue G250*. MM: Massa Molecular; kDa: Quilodalton.

O próximo passo consistiu na avaliação das proteínas diferencialmente abundantes através da técnica de DIGE.

Assim, para selecionar proteínas diferencialmente abundantes entre macrófagos infectados com as diferentes espécies de *Leishmania*, o extrato proteico de cada grupo experimental foi marcado com fluoróforos, conforme citado anteriormente e, em seguida, fracionado em *strips* de 17 cm, pH 4 - 7. Os géis foram digitalizados através do aparelho *Typhoon FLA 9000* (GE Healthcare) e, em sequência, as imagens geradas foram importadas para o *software DeCyder v. 7.2* (GE Healthcare). Os *spots* de cada imagem foram detectados e quantificados no módulo DIA e editados manualmente para correção de inclusões ou exclusões indevidas. Após edição e refinamento dos parâmetros, foi observado um total de 1139 *spots* no

grupo de macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*, 1137 *spots* nos macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e 1280 *spots* no grupo de macrófagos não infectados. A próxima etapa da análise ocorreu no módulo BVA, no qual foi realizado o *match* entre as imagens através da sobreposição dos *spots* em comum entre cada imagem. Ao fim deste processo, foi avaliada a diferença de abundância entre as amostras através dos testes estatísticos *T Student* e *One-Way ANOVA* ($p \leq 0,05$) e valor de *ratio* $\geq 1,5$. Na Figura 12 estão representados *spots* que apresentaram diferença de intensidade estatisticamente significativa entre grupos experimentais.

Figura 12 - Imagens tridimensionais representativas de *spots* selecionados com diferença de intensidade



Fonte: Elaborada pela autora.

- 1) *Spot* marcado em rosa com aumento de intensidade em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* (A) em relação a macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* (B); 2) *Spot* marcado em rosa mais intenso em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* (A) em relação a macrófagos não infectados (B).

As análises revelaram um total de 45 *spots* com diferenças de intensidade estatisticamente significativas entre os três grupos estudados, sendo 22 oriundos da comparação entre M ϕ _Li e M ϕ _La, 8 entre M ϕ _Li e M ϕ _N, e 15 entre M ϕ _La x M ϕ _NI. No entanto, é importante observar que houve compartilhamento de *spots* diferencialmente intensos entre os grupos experimentais. Sendo assim, 11 *spots* foram detectados em M ϕ _Li, 11 em M ϕ _La e 7

em Mφ_NI, totalizando 29 *spots* a serem identificados. Estes dados estão demonstrados na Tabela 5 e nas Figuras 13, 14 e 15.

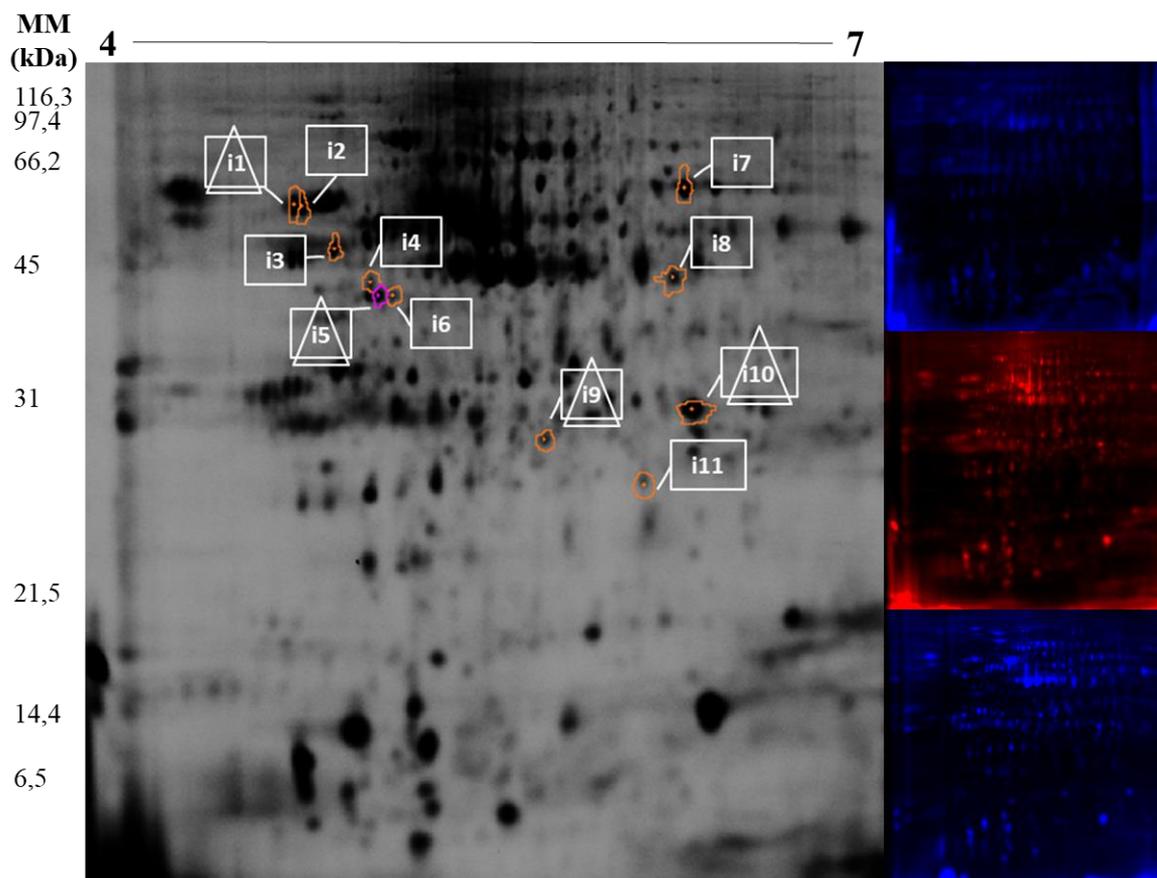
Tabela 5 - Número de *spots* diferencialmente intensos ($p \leq 0,05$ e $ratio \geq 1,5$) entre os grupos experimentais

Grupo experimental	Análise comparativa	Nº de <i>spots</i> com intensidade aumentada	Total
Mφ_Li	Mφ_Li x Mφ_La	11	15
	Mφ_Li x Mφ_NI	4	
Mφ_La	Mφ_La x Mφ_Li	11	21
	Mφ_La x Mφ_NI	10	
Mφ_NI	Mφ_NI x Mφ_Li	4	9
	Mφ_NI x Mφ_La	5	

Fonte: Elaborada pela autora.

Mφ_Li: macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*; Mφ_La: macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*; Mφ_NI: macrófagos não infectados.

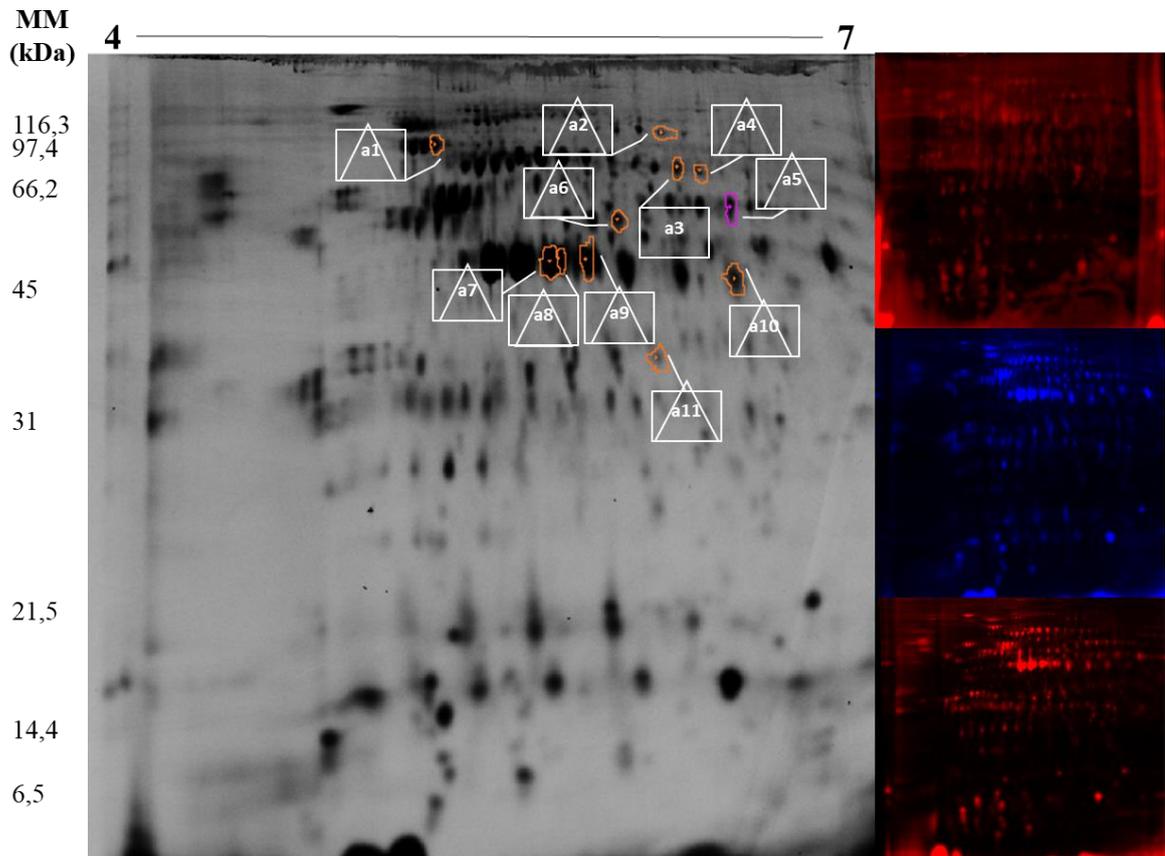
Figura 13 - Spots com aumento de intensidade em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*



Fonte: Elaborada pela autora.

Géis DIGE de 18 cm, pH 4 – 7. Seleção dos spots mais intensos no grupo M ϕ _Li em relação a M ϕ _La (retângulo) e M ϕ _NI (triângulo). As imagens azuis e vermelhas representam a amostra marcada com os fluoróforos Cy3 e Cy5, respectivamente. Cada amostra é marcada três vezes, alternando-se os corantes. MM: Massa Molecular; kDa: Quilodalton.

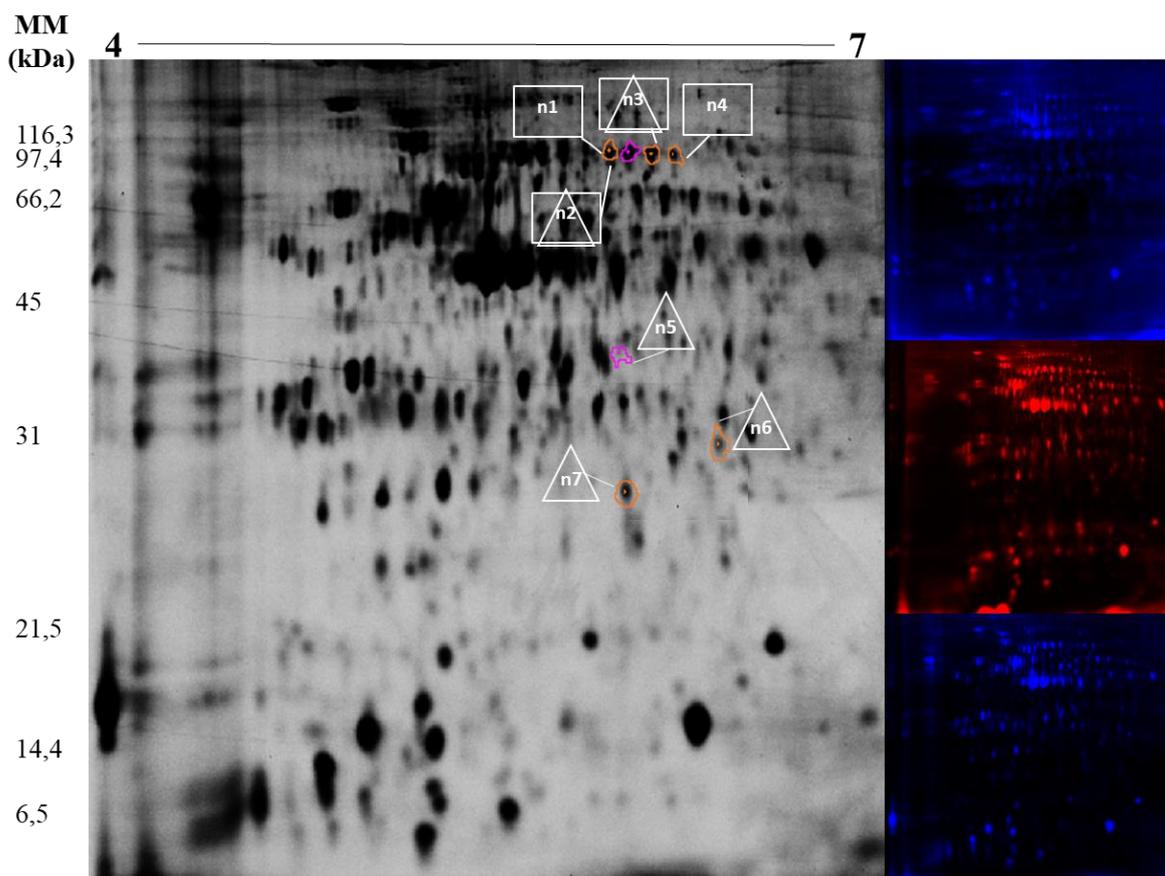
Figura 14 - Spots com aumento de intensidade em macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*



Fonte: Elaborada pela autora.

Géis DIGE de 18 cm, pH 4 – 7. Seleção dos *spots* mais intensos no grupo M ϕ _La em relação a M ϕ _Li (retângulo) e M ϕ _NI (triângulo). As imagens azuis e vermelhas representam a amostra marcada com os fluoróforos Cy3 e Cy5, respectivamente. Cada amostra é marcada três vezes, alternando-se os corantes. MM: Massa Molecular; kDa: Quilodalton.

Figura 15 - Spots com aumento de intensidade em macrófagos não infectados



Fonte: Elaborada pela autora.

Géis DIGE de 18 cm, pH 4 – 7. Seleção dos *spots* mais intensos no grupo M ϕ _NI em relação a M ϕ _Li (retângulo) e M ϕ _La (triângulo). As imagens azuis e vermelhas representam a amostra marcada com os fluoróforos Cy3 e Cy5, respectivamente. Cada amostra é marcada três vezes, alternando-se os corantes. MM: Massa Molecular; kDa: Quilodalton.

2.3.1 Identificação das proteínas

Do total de 29 *spots* diferencialmente intensos que foram tratados e submetidos à identificação por espectrometria de massa por MALDI-TOF/TOF, 15 (51,7%) foram identificados com sucesso, correspondendo a 11 proteínas distintas. Em ambos os grupos de macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, seis proteínas foram identificadas nos 11 *spots* selecionados. Nenhuma proteína foi identificada dentre os sete *spots* mais intensos do grupo de macrófagos não infectados, o que foi decorrente da baixa concentração de peptídeos na amostra ou *score* de identificação não significativo no MASCOT (Tabela 6).

Tabela 6 - Proteínas identificadas nos spots diferencialmente intensos

Grupo experimental	Spot	Identificador (UNIPROT)	Gene	Anotação funcional	Abundância	Ratio			
↑ Mφ_Li	i1	P08113	Hsp90b1	Endoplasmin	↓ Mφ_NI	7,13			
					↓ Mφ_La	6,43			
	i2	P08113	Hsp90b1	Endoplasmin	↓ Mφ_La	3,4			
	i3	P20152	Vim	Vimentin	↓ Mφ_La	2,29			
	i5	P08113	Hsp90b1	Endoplasmin	↓ Mφ_NI	11,36			
					↓ Mφ_La	6,82			
	i6	P08113	Hsp90b1	Endoplasmin	↓ Mφ_La	2,92			
	i7	P27773	Pdia3	Protein disulfide-isomerase	↓ Mφ_La	1,71			
	i9	P60710	Actb	Actin, cytoplasmic	↓ Mφ_NI	1,77			
					↓ Mφ_La	2,02			
	i10	P24452	Capg	Macrophage-capping protein	↓ Mφ_NI	11,71			
↓ Mφ_La					6,86				
i11	O70370	Ctss	Cathepsin S	↓ Mφ_La	1,65				
↑ Mφ_La	a1	P20029	Hspa5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	↓ Mφ_NI	2,99			
					↓ Mφ_Li	2,64			
	a5	Q9D1A2	Cndp2	Cytosolic non-specific dipeptidase	↓ Mφ_NI	2,15			
					↓ Mφ_Li	2,16			
	a6	P18242	Ctsd	Cathepsin D	↓ Mφ_NI	1,91			
					↓ Mφ_Li	2,14			
	a7	P60710	Actb	Actin, cytoplasmic 1	↓ Mφ_NI	3,21			
					P63260	Actg1	Actin, cytoplasmic 2	↓ Mφ_Li	3,16
								Q8BFZ3	Actbl2
	a8	P60710	Actb	Actin, cytoplasmic 1	↓ Mφ_NI	2,97			
					P63260	Actg1	Actin, cytoplasmic 2	↓ Mφ_Li	2,85
								Q8BFZ3	Actbl2
	a9	P60710	Actb	Actin, cytoplasmic 1	↓ Mφ_NI	4,24			
P63260					Actg1	Actin, cytoplasmic 2	↓ Mφ_Li	3,78	

Fonte: Elaborada pela autora.

Mφ_Li: macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*; Mφ_La: macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*; Mφ_NI: macrófagos não infectados; ↑: intensidade aumentada; ↓: intensidade diminuída.

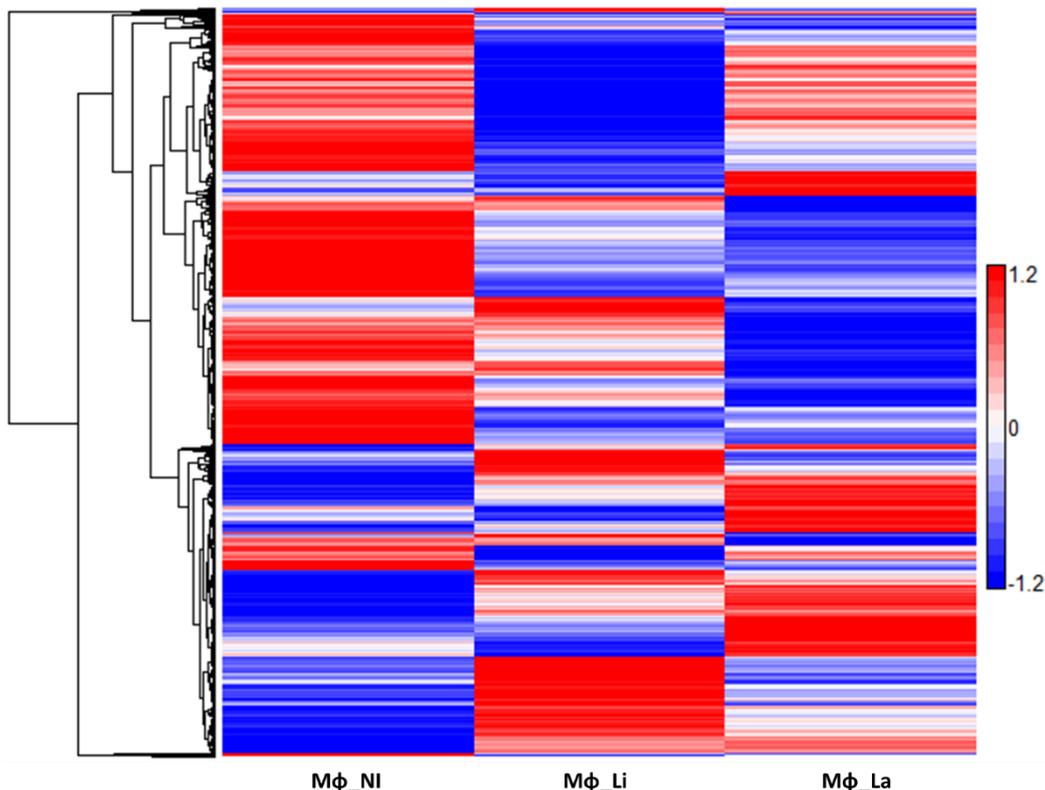
2.4 Tandem Mass Tag (TMT)

Além da técnica de DIGE, a marcação dos peptídeos por TMT seguida de LC-MS/MS também foi aplicada para comparar proteínas de macrófagos diferencialmente abundantes em resposta à infecção por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*.

A abordagem livre de gel e com marcação por isóbaros adotada permitiu a identificação e quantificação de um total de 5.939 proteínas não redundantes de *Mus musculus*. Para melhor

visualizar a variação de intensidade das mesmas entre Mφ_Li, Mφ_La e Mφ_NI, foi construído um agrupamento hierárquico representado na Figura 16. É possível notar que as proteínas formaram agrupamentos distintos entre os três grupos experimentais.

Figura 16 - Heatmap das proteínas identificadas nos 3 grupos experimentais



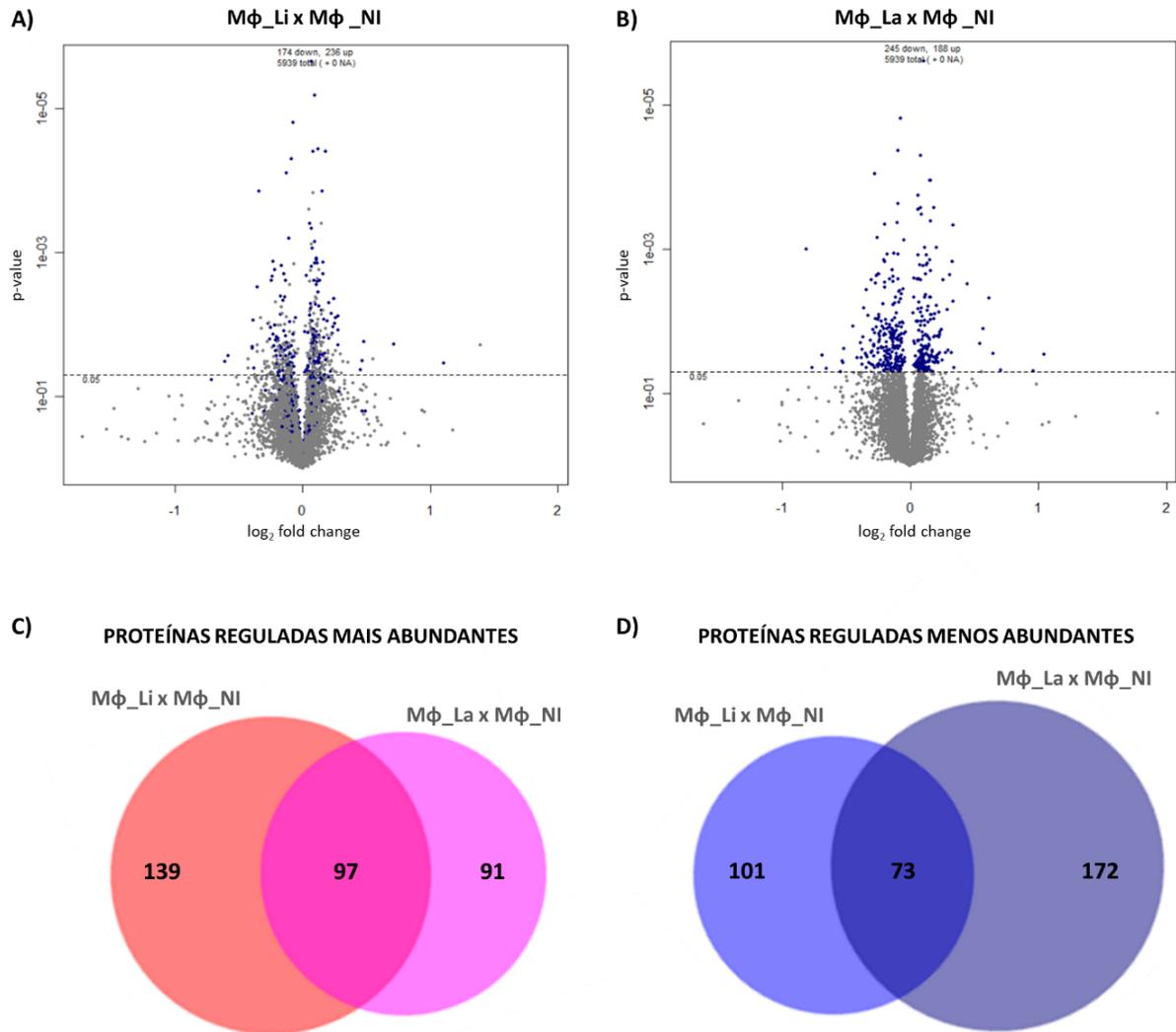
Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores foram obtidos pelo cálculo da média das intensidades das quatro replicatas de cada grupo experimental. Mφ_Li: macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*; Mφ_La: macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*; Mφ_NI: macrófagos não infectados.

A fim de avaliar as alterações significativas na abundância das proteínas, os valores de intensidade relativa das mesmas foram comparados entre os grupos experimentais. Desta forma, 410 proteínas foram consideradas reguladas ($p < 0,05$) entre os grupos Mφ_Li e Mφ_NI, sendo 236 delas mais abundantes em Mφ_Li e 174 menos abundantes (Figura 17A). Quando comparado ao grupo controle (Mφ_NI), o número de proteínas aumentadas e diminuídas em Mφ_La foi de 188 e 245, respectivamente, totalizando 433 proteínas reguladas (Figura 17B). Subsequentemente, foi realizada uma análise de sobreposição entre as proteínas mais e menos abundantes em Mφ_Li e Mφ_La. Das 410 e 433 proteínas reguladas em Mφ_Li e Mφ_La, respectivamente, foram observadas 97 reguladas positivamente em macrófagos infectados pelas duas espécies, enquanto 73 proteínas apresentaram regulação negativa. Com relação à resposta

frente à infecção por cada uma destas espécies, foi visto que a infecção por *L. (L.) infantum* resultou no aumento de 139 proteínas e na diminuição de 101. Em contrapartida, 91 proteínas mostraram-se mais abundantes em macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis*, enquanto 172 tiveram abundância diminuída (Figura 17C e D).

Figura 17 - Volcano plot e diagrama de Venn das proteínas reguladas



Fonte: Elaborada pela autora.

Volcano plot das proteínas com alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na abundância em Mφ_Li (A) e Mφ_La (B) com relação a Mφ_NI. Os valores de p foram determinados utilizando o teste ANOVA a partir das 4 replicatas biológicas. Valores negativos de *fold change* representam proteínas reguladas negativamente, enquanto valores positivos indicam proteínas reguladas positivamente. As proteínas com aumento (C) e diminuição (D) de abundância em Mφ_Li e Mφ_La foram sobrepostas para identificação de proteínas compartilhadas ou exclusivas entre macrófagos infectados por ambas as espécies.

2.4.1 Análise de Ontologia Gênica (GO) e vias do KEGG

As proteínas exclusivamente reguladas em M ϕ _Li e M ϕ _La, bem como as proteínas reguladas em ambos os grupos foram submetidas à análise de GO para avaliar seu envolvimento em processos biológicos e funções moleculares.

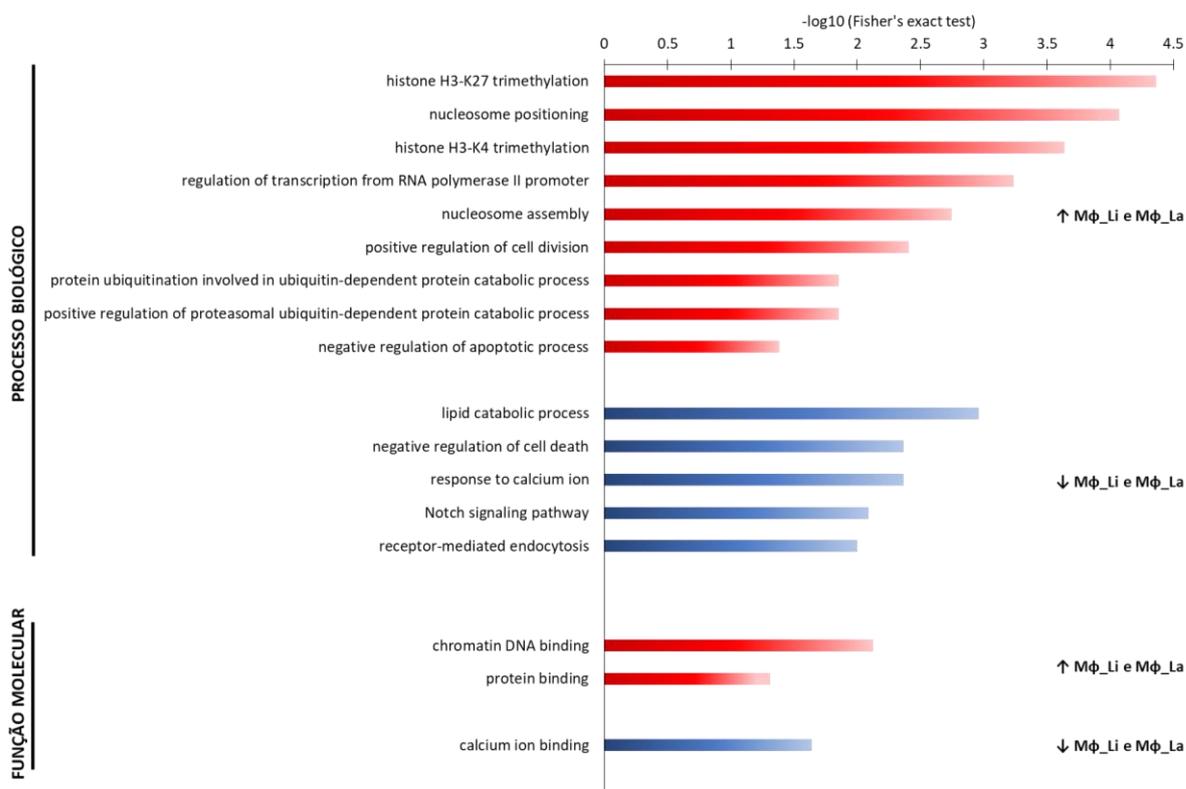
Um perfil de enriquecimento de GO distinto foi observado na análise das 170 proteínas reguladas e compartilhadas entre M ϕ _Li e M ϕ _La. Enquanto as 97 proteínas mais abundantes estavam envolvidas com trimetilação de histona H3-K27, trimetilação de histona H3-K4, posicionamento de nucleossomo e regulação de transcrição do promotor da RNA polimerase II, os termos associados às 73 proteínas menos abundantes estavam relacionados ao processo catabólico de lipídeos, regulação negativa de morte celular, resposta a íons de cálcio, via de sinalização *Notch* e endocitose mediada por receptor. As proteínas reguladas positivamente foram representadas, principalmente, pelas funções de ligação à cromatina e a proteínas, e aquelas com regulação negativa foram relacionadas mais significativamente à atividade de ligação a íons de cálcio (Figura 18).

A análise das 240 proteínas reguladas exclusivamente em M ϕ _Li mostrou um agrupamento distinto entre as proteínas mais e menos abundantes. Transporte de endossomo para melanosomo, desmetilação de DNA, desenvolvimento dendrítico espinal e resposta imune adaptativa estavam entre os principais processos biológicos das 139 proteínas aumentadas em M ϕ _Li. Em contrapartida, os processos biológicos encontrados nas 101 proteínas diminuídas estavam mais associados à secreção pela célula, regulação negativa do processo apoptóticos de leucócitos, regulação negativa de fosforilação e processo apoptótico. Quanto às funções moleculares, atividade carreadora de elétrons, atividade de tirosina fosfatase não abrangente a membrana e atividade catalítica se destacaram entre as proteínas mais abundantes de M ϕ _Li, enquanto ligação a receptor nuclear ligante-dependente, atividade de regulador de óxido nítrico sintase e ligação a NAD foram as funções enriquecidas entre as proteínas menos abundantes (Figura 19).

Quanto a análise das proteínas exclusivamente reguladas em M ϕ _La, as 91 proteínas mais abundantes estavam envolvidas, principalmente, na regulação do processo catabólico glicogênio, regulação positiva da via de sinalização de receptor de insulina e regulação do processo biosintético de glicogênio. Já as 172 proteínas com abundância diminuída neste mesmo grupo estavam associadas, sobretudo, à regulação de exocitose de neurotransmissor dependente de íons de cálcio, processo catabólico de cAMP, sinalização ativada por

angiotensina e produção de IL-1 β . Também foi observado que transportador de fosfolípido, ATPase e proteína serina/tirosina fosfatase se encontravam entre as atividades mais significativamente enriquecidas das proteínas com regulação positiva. Considerando as proteínas reguladas negativamente, as funções de atividade de hidrolase fosfórico diéster, atividade de ativador de peptidase envolvido no processo apoptótico e ligação de fosfatidilinositol foram as mais significativas (Figura 20).

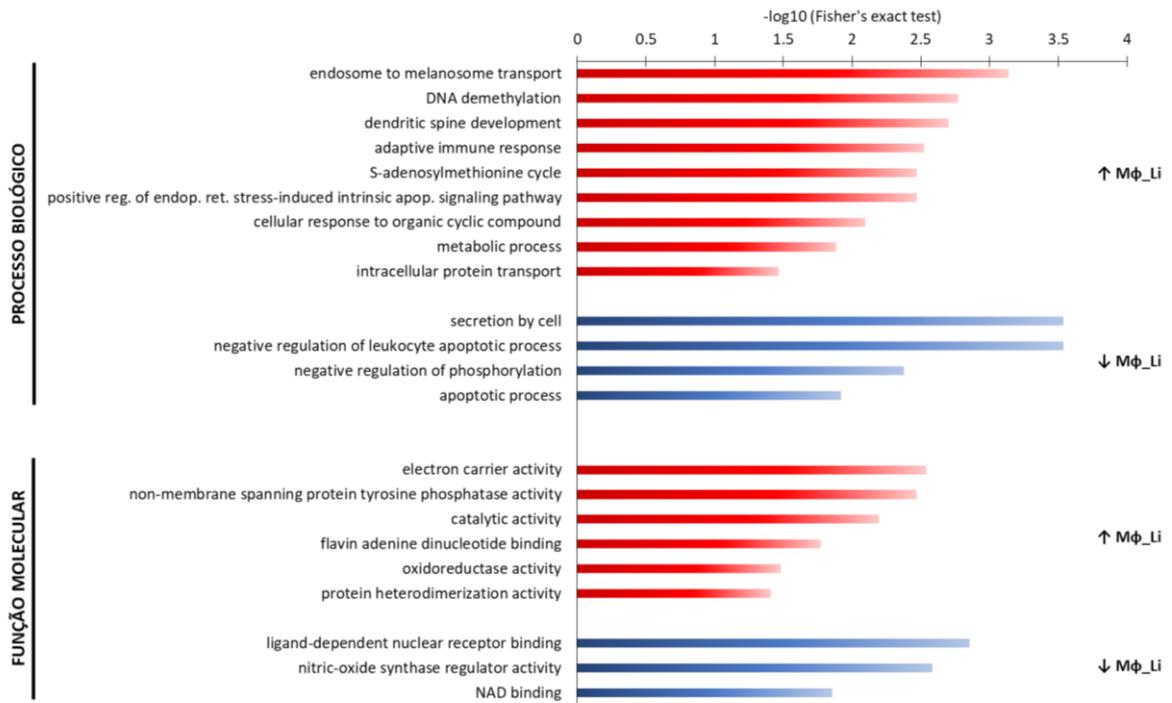
Figura 18 - Enriquecimento de GO das proteínas reguladas e compartilhadas em M ϕ _Li e M ϕ _La



Fonte: Elaborada pela autora.

Processos biológicos e funções moleculares mais significativos ($p < 0,05$) com as quais as 97 proteínas mais abundantes (vermelho) e as 73 menos abundantes (azul) estavam envolvidas. Vias mais enriquecidas são representadas por menores valores de p. A análise foi realizada utilizando como referência as 5.939 proteínas identificadas.

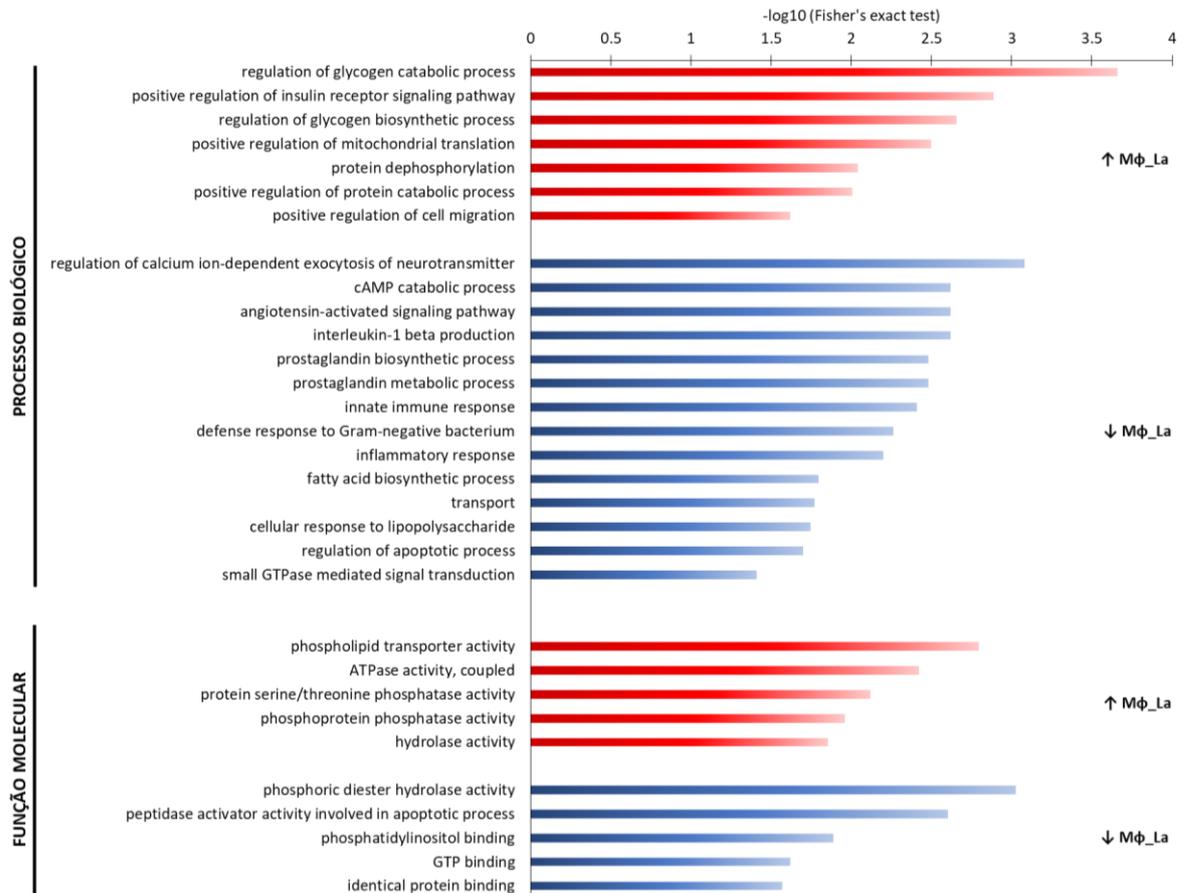
Figura 19 - Enriquecimento de GO das proteínas reguladas em Mφ_Li



Fonte: Elaborada pela autora.

Processos biológicos e funções moleculares mais significativos ($p < 0,05$) com as quais as 139 proteínas mais abundantes (vermelho) e as 101 menos abundantes (azul) de Mφ_Li estavam envolvidas. Vias mais enriquecidas são representadas por menores valores de p . A análise foi realizada utilizando como referência as 5.939 proteínas identificadas.

Figura 20 - Enriquecimento de GO das proteínas reguladas em Mφ_La

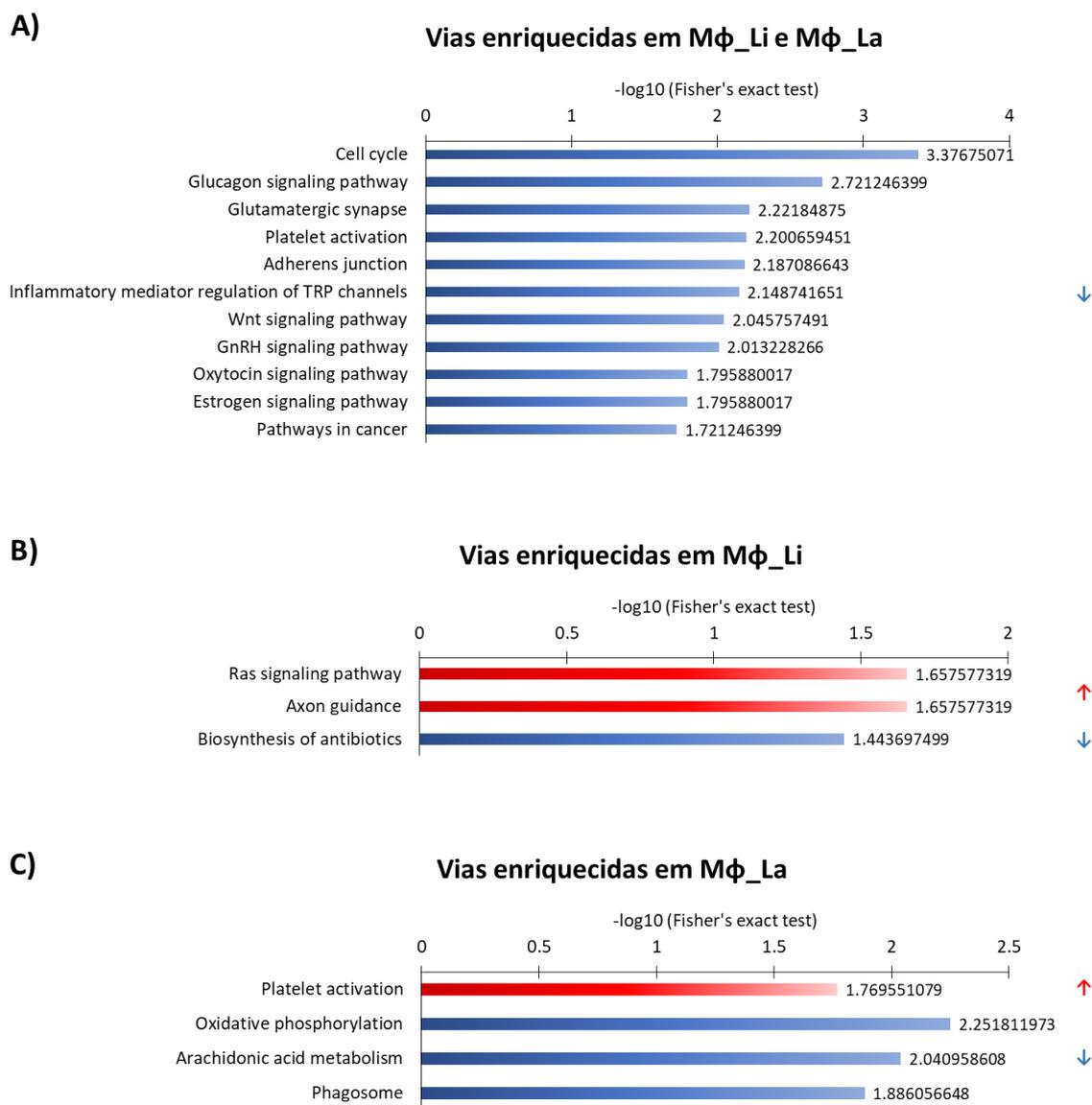


Fonte: Elaborada pela autora.

Processos biológicos e funções moleculares mais significativos ($p < 0,05$) com as quais as 91 proteínas mais abundantes (vermelho) e as 172 menos abundantes (azul) de Mφ_La estavam envolvidas. Vias mais enriquecidas são representadas por menores valores de p . A análise foi realizada utilizando como referência as 5.939 proteínas identificadas.

A ferramenta KEGG foi aplicada na busca da identificação das vias mais relevantes associadas às proteínas reguladas nos macrófagos infectados com as diferentes espécies de *Leishmania*. Em se tratando das proteínas reguladas simultaneamente entre Mφ_Li e Mφ_La (Figura 21A), a análise mostrou o enriquecimento de vias somente entre as menos abundantes. Um total de 11 vias foram identificadas como significativas, destacando-se ciclo celular (Figura 22), sinalização de glucagon, sinapses glutamatérgicas e ativação de plaquetas. Como mostrado na Figura 21B, as proteínas mais abundantes de Mφ_Li participam da via de sinalização Ras (Figura 23) e da orientação de axônio, ao passo que as proteínas menos abundantes estão envolvidas unicamente com a biossíntese de antibióticos. A análise das vias das proteínas reguladas em Mφ_La (Figura 21C) identificou o envolvimento das proteínas aumentadas com a ativação de plaquetas. Por sua vez, as proteínas reguladas negativamente participam da fosforilação oxidativa, do metabolismo de ácido araquidônico e fagossomo (Figura 24).

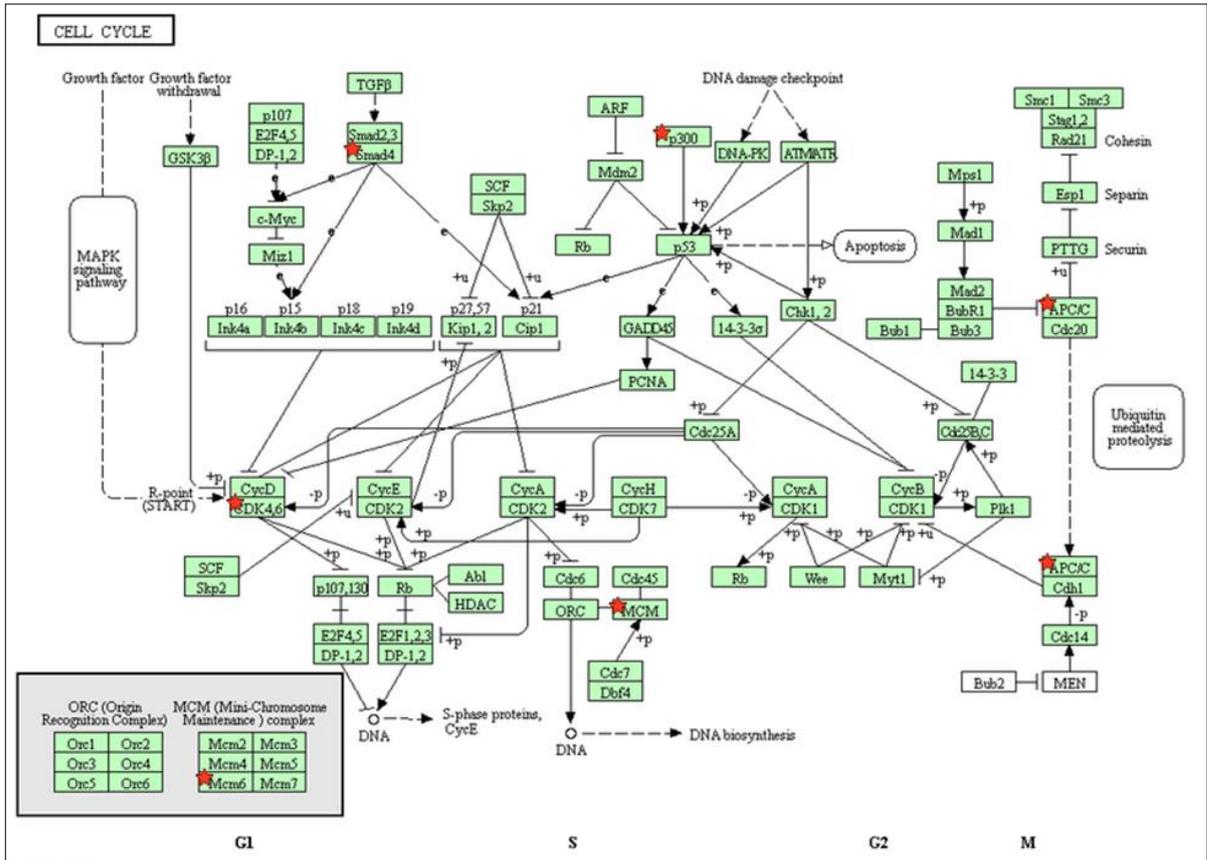
Figura 21 - Análise de enriquecimento de vias nas proteínas reguladas entre os grupos experimentais



Fonte: Elaborada pela autora.

Vias mais significativas ($p < 0,05$) geradas pela ferramenta KEGG com as quais as proteínas reguladas positivamente (vermelho) e negativamente (azul) estão envolvidas. Quanto menor o valor de p, mais enriquecida a via. A análise foi realizada utilizando como referência as 5.939 proteínas identificadas.

Figura 22 - Via do Ciclo Celular enriquecida na análise pelo KEGG das proteínas com abundância diminuída em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*



Fonte: DAVID e KEGG

As proteínas destacadas (estrela vermelha) estão reguladas negativamente em Mφ_Li e Mφ_La.

3 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou quantitativamente a abundância de proteínas de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C após 72 horas de infecção *in vitro* por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, individualmente. Utilizando DIGE, uma média de 1.185 *spots* foram detectados, dos quais 29 (2,4%) foram selecionados como diferencialmente intensos. Um total de 11 diferentes proteínas foram identificadas em 15 dos 29 *spots* diferencialmente intensos em macrófagos infectados por ambas as espécies. Em contrapartida, utilizando marcação de peptídeos com etiquetas isobáricas seguida de identificação por LC-MS/MS, um total de 5.939 proteínas foram quantificadas, das quais 673 (11,3%) estavam reguladas. Este resultado demonstra a menor sensibilidade da técnica DIGE. No entanto, a análise de proteínas utilizando a eletroforese em gel bidimensional possibilita o conhecimento de massa, ponto isoelétrico e possíveis modificações pós-traducionais das mesmas. No entanto, uma das limitações desta abordagem é a falha na detecção de proteínas pouco abundantes, de alto ou baixo peso molecular, bem como de proteínas muito ácidas ou básicas (ABDALLAH *et al.*, 2012). Já a quantificação de proteínas utilizando marcação de peptídeos com etiquetas isobáricas e identificação por LC-MS/MS é uma abordagem que não se baseia em gel e apresenta maior sensibilidade. As etapas de separação e identificação das proteínas ocorrem de forma acoplada, conferindo maior automação ao processo, e maior número de amostras podem ser analisados ao mesmo tempo (ABDALLAH *et al.*, 2012).

Todas as proteínas identificadas nos *spots* mais intensos em Mφ_Li foram identificadas na análise de TMT, porém somente a proteína endoplasmica estava regulada nesta última. Além disso, endoplasmica se mostrou simultaneamente diminuída em Mφ_Li e Mφ_La analisados por TMT. Por outro lado, dentre as seis proteínas identificadas nos *spots* com maior intensidade em Mφ_La, duas delas não foram identificadas utilizando a abordagem *gel free*, sendo elas catepsina D (Ctsd) e actina citoplasmática 2 (Actg1). Foi observado que, apesar de a técnica de TMT ser mais sensível que a de DIGE, houve complementariedade entre as duas abordagens, como já relatado por outros autores (FIALHO JR, 2017; SINCLAIR *et al.*, 2011; WESTMAN; TAHERZADEH; FRANZÉN, 2012). Já a aparente contradição de regulação, a exemplo da endoplasmica, em que uma técnica mostrou regulação positiva e a outra regulação negativa, pode ser explicada pelo fato de que no DIGE as proteínas estão fracionadas de acordo com pI e MM, o que permite a separação de isoformas.

A endoplasmina é uma importante proteína associada à resposta imune inata e foi identificada em quatro *spots* que apresentaram aumento de intensidade no grupo M ϕ _Li quando comparado a M ϕ _La e M ϕ _NI. Também chamada de Hsp90b1 ou gp96, a endoplasmina é uma chaperona do retículo endoplasmático com papel crucial no dobramento e função de receptores do tipo *Toll* (TLRs), os quais reconhecem estruturas moleculares associadas a microorganismos e controlam a ativação de fatores de transcrição, iniciando a resposta imune. Randow e Seed (2001) mostraram que a expressão de TR1, TLR2 e TLR4 na superfície das células é dependente de gp96, uma vez que células deficientes em gp96 retêm estes receptores intracelularmente. A associação entre gp96 e TLRs também foi estudada por Yang *et al.* (2007), em que macrófagos de camundongos *knockout* para gp96 perdem a capacidade de responder a estímulos da resposta imune inata pela deficiência na função de TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 e TLR9. Além disso, quando submetidos à infecção pela bactéria *Listeria monocytogenes*, os animais exibiram maior suscetibilidade se comparados ao grupo controle.

Com relação aos resultados de M ϕ _La, três diferentes actinas foram identificadas em *spots* mais intensos neste grupo experimental, sendo elas: *actin*, *cytoplasmic 1* (Actb), *actin*, *cytoplasmic 2* (Actg1) e *beta-actin-like protein 2* (Actbl2). Actinas são proteínas muito conservadas e que estão envolvidas em vários tipos de motilidade celular. As identificadas na análise de DIGE deste trabalho pertencem aos grupos β (Actb e Actbl2) e γ (Actg1), as quais são sintetizadas por células não musculares nos mamíferos e compõem o citoesqueleto, mediando a motilidade celular interna (ERBA *et al.*, 1988). A γ -actina encontra-se no estado monomérico e pode ser polimerizada em filamentos como a F-actina. Esses filamentos estão relacionados com a contração, endocitose, locomoção celular, adesão ao substrato e transporte de organelas. Na infecção por *Leishmania*, o citoesqueleto formado por F-actina contribui para a formação do vacúolo no macrófago, e também como barreira que impede a fusão do vacúolo parasitóforo com o lisossomo. Entretanto, este processo não foi observado em vacúolos contendo *L. (L.) amazonensis* (COURRET *et al.*, 2002), os quais são grandes e abrigam numerosas amastigotas (ANTOINE *et al.*, 1998). Os dados experimentais aqui apresentados não permitem especular que o aumento de actina nos macrófagos esteja associado com aumento da motilidade da célula ou número de amastigotas por célula.

A análise de TMT mostrou que 170 proteínas são concomitantemente reguladas em macrófagos infectados tanto por *L. (L.) infantum* quanto por *L. (L.) amazonensis*. Em contrapartida, 240 proteínas são exclusivamente reguladas em macrófagos infectados por *L. (L.) infantum*, enquanto 273 proteínas são alteradas somente na infecção por *L. (L.)*

amazonensis (Figura 17C e D). As análises de enriquecimento realizadas utilizando cada um destes grupos de proteínas revelaram que processos biológicos, funções moleculares e vias são modulados de maneira distinta nos macrófagos dependendo da espécie em questão.

3.1 Mecanismos epigenéticos

Alterações epigenéticas se destacaram entre os processos e funções mais significativos entre as proteínas com abundância aumentada em macrófagos infectados pelas duas espécies de *Leishmania* deste estudo, tendo sido mais representativo em *L. (L.) infantum*. O termo epigenética refere-se a processos que alteram a expressão gênica sem envolver mudanças na sequência de DNA. Estas mudanças podem ser transmitidas a linhagens de células sucessoras, podendo, também, ser reversíveis. A regulação gênica é controlada por diversos mecanismos epigenéticos, como metilação do DNA, modificações pós-traducionais (MPTs) de histonas (fosforilação, acetilação e metilação), remodelamento de cromatina e através de RNAs não codificantes (ncRNA) (MONERRI; KIM, 2014). Proteínas aumentadas simultaneamente na infecção por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* estavam associadas à trimetilação da lisina K27 da histona H3, posicionamento de nucleossomo, trimetilação da lisina K4 da histona H3, montagem de nucleossomo e ligação ao DNA da cromatina (Figura 18). Enquanto isso, a desmetilação do DNA foi um processo que se destacou na análise das proteínas reguladas positivamente em células infectadas por *L. (L.) infantum* (Figura 19).

Diversos patógenos intracelulares desenvolveram estratégias para induzir alterações epigenéticas na célula hospedeira, gerando um ambiente favorável para sua multiplicação e persistência e, assim, promovendo sua própria sobrevivência (MCMASTER; MORRISON; KOBOR, 2016). Grande parte dos trabalhos disponíveis na literatura são direcionados a alterações na célula hospedeira induzidas pela infecção por vírus e bactérias (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2009; PION *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2016). Contudo, alguns trabalhos investigam a participação de leveduras de importância médica e protozoários na modificação de histonas do hospedeiro. Leopold Wager *et al.* (2018) mostraram que a inibição do complexo enzimático que promove a trimetilação de H3K4 levou à diminuição da produção de citosinas pró-inflamatórias (IL-2, IFN- γ e TNF- α) por macrófagos esplênicos de murinos que receberam segundo desafio após imunização prévia contra a *Cryptococcus neoformans*. Neste mesmo trabalho, a adição do inibidor de trimetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27) também teve como consequência a diminuição destas mesmas citocinas. A

trimetilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me3) está frequentemente associada com a ativação da transcrição gênica em macrófagos, ao passo que a trimetilação de H3K27 (H3K27me3) geralmente se relaciona à regulação negativa da transcrição por compactação da estrutura da cromatina (FRANCIS; KINGSTON; WOODCOCK, 2004). Assim, os autores sugerem um papel indireto para H3K27me3 na produção de citocinas pelos macrófagos.

Trabalhos que investigam a indução de mecanismos epigenéticos na célula hospedeira pela infecção por protozoários se concentram em organismos do filo Apicomplexa. *Toxoplasma gondii*, por exemplo, induz a imunossupressão em macrófagos murinos através da desacetilação de histonas, dificultando a ligação de fatores de transcrição de genes induzidos por IFN- γ . Desta forma, a célula se torna incapaz de responder ao estímulo por IFN- γ , que é a principal citocina controladora da replicação do parasito (LANG, C. *et al.*, 2012). Outro estudo interessante apontou que a infecção por *T. gondii* reduz a metilação do promotor de arginina vasopressina no cérebro de ratos *Winstar*, aumentando a transcrição do gene. Segundo os autores, esta alteração pode explicar a mudança de comportamento em ratos infectados por este parasito, os quais passam a ter menor aversão ao odor de gatos, podendo ser inclusive atraídos pelos mesmos (HARI DASS; VYAS, 2014). Marr *et al.* (2014) demonstraram pela primeira vez que a infecção por *Leishmania* leva a modificações epigenéticas no genoma da célula hospedeira. Infectando macrófagos THP-1 com *L. (L.) donovani*, notaram a ocorrência de alterações no padrão de metilação de sítios de CpG no DNA da célula, o que levou a mudanças no padrão de expressão de genes que facilitam a replicação e sobrevivência do parasito. Os autores selecionaram cinco genes que mostraram variações no padrão de metilação de CpG entre macrófagos infectados e não infectados (LARS2, ADPRHHL1, HDAC4, CDC42EP3 e IRAK2) e a expressão de quatro destes genes foi inversamente correlacionada com a metilação do DNA, significando que a desmetilação ativou a transcrição gênica. No presente trabalho, a desmetilação de DNA foi um processo observado entre as proteínas aumentadas no grupo de macrófagos infectados por *L. (L.) infantum* (Figura 19). Considerando o que foi exposto, a infecção por *Leishmania* parece afetar a resposta do macrófago ao promover alterações epigenéticas que ativam ou inibem a transcrição de genes por diferentes mecanismos. Algumas modificações podem ser resultantes da infecção por si, enquanto outras podem ser induzidas por determinadas espécies do parasito.

Analisando as proteínas envolvidas nos termos de GO enriquecidos relacionados à epigenética, a classe de histonas H1 foi super-representada. Histonas H1 são parte do nucleossomo, unidade estrutural da cromatina que inclui um octâmero das histonas H2A, H2B,

H3 e H4, o qual é circundado por DNA de aproximadamente 147 pb, uma histona ligante (H1) e DNA ligante cujo tamanho varia de 20 – 60 pb. Histonas ligantes facilitam o empacotamento dos nucleossomos em estruturas mais compactas e estabilizam o complexo. Além disso, elas compõem a classe mais diversa de histonas, havendo 11 diferentes isoformas em células de mamíferos. As identificadas neste trabalho constituem variantes somáticas específicas da fase S do ciclo celular, sendo expressas em todas as células e tecidos (KALASHNIKOVA; ROGGE; HANSEN, 2016; YE *et al.*, 2017). Histonas H1 não têm sido estudadas muito profundamente, mas seu papel na regulação epigenética, regulação da replicação de DNA, reparo de DNA e estabilidade do genoma tem sido descrito. Foi observada a depleção de H1 em regiões promotoras de genes ativamente transcritos, ricas em H3K4, ao passo que a presença de H1 é vista aumentada em domínios de cromatina silenciados, onde se encontram marcadores de repressão, como H3K27 (FYODOROV *et al.*, 2018).

3.2 Resposta imune na infecção por *L. (L.) infantum*

A resposta imune adaptativa se mostrou enriquecida na análise das proteínas mais abundantes de macrófagos infectados com *L. (L.) infantum* (Figura 19). Dentre as proteínas envolvidas neste processo, encontra-se a proteína TAP1, que participa da via citosólica de apresentação de antígenos através de MHC-I. Juntamente com a TAP2, TAP1 forma o heterodímero TAP, o qual realiza o transporte de peptídeos processados no proteossoma até o retículo endoplasmático para serem entregues às moléculas de MHC-I. Estas se deslocam para a membrana plasmática do macrófago para apresentação do antígeno a linfócitos T CD8+. Uma proteína de grande importância no processo é a peptidase Erap1, também aumentada em M ϕ _Li, a qual apra os peptídeos até que fiquem no tamanho adequado para se acoplarem a MHC-I (BLUM; WEARSCH; CRESSWELL, 2013). O envolvimento de linfócitos T CD8⁺ já foi relatado em infecções murinas por *Leishmania*, o que é intrigante. A ativação desta linhagem celular implica na ligação de MHC-I com antígenos do parasito, porém esta molécula se associa a antígenos citosólicos, e não exógenos, como é o caso de *Leishmania*. A forma como antígenos do parasito encontram as moléculas de MHC-I ainda não está clara. Lang *et al.* (1994) sugeriram que moléculas de MHC classe I poderiam alcançar o vacúolo parasitóforo onde amastigotas estariam sendo processadas, mas os resultados encontrados no estudo não confirmaram esta hipótese. Rittig e Bogdan (2000) acreditam que formas promastigotas e

amastigotas de *Leishmania* podem ser encontradas no citosol da célula hospedeira, o que poderia sugerir processamento pela via citossólica de apresentação antigênica.

3.3 Inibição da apoptose e inflamação

A apoptose consiste na autodigestão controlada da célula pela ativação de proteases endógenas e tem como principal função a preservação da homeostase, mantendo o equilíbrio entre proliferação e morte celular. Não somente, este processo atua como um mecanismo de defesa da célula contra a infecção por agentes infecciosos, resultando na eliminação de ambos (VAUX; HAECKER; STRASSER, 1994). Patógenos intracelulares desenvolveram estratégias para contrapor o processo de apoptose da célula hospedeira, permitindo maior tempo para replicação (HEUSSLER; KÜENZI; ROTTENBERG, 2001). A resistência de macrófagos de diversas linhagens de camundongos à apoptose frente a infecção por diferentes espécies de *Leishmania* já foi relatada por numerosas investigações (AGA *et al.*, 2002; AKARID *et al.*, 2004; LISI *et al.*, 2005; RUHLAND; LEAL; KIMA, 2007). Da mesma maneira, os resultados aqui encontrados sugerem que a infecção por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* inibe o processo apoptótico nos macrófagos.

A análise de enriquecimento de GO mostrou a participação da proteína Fas (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*) nos processos de regulação do processo apoptótico e resposta inflamatória, assim como na função ligação de proteína idêntica (*identical protein binding*) (Figura 20). A diminuição da abundância desta proteína foi observada exclusivamente em macrófagos infectados com a espécie *L. (L.) amazonensis*. Fas é membro da família de receptores de fator de necrose tumoral localizado na superfície de células imunes e não imunes e participa da via extrínseca da apoptose (SUDA *et al.*, 1993). Este processo é iniciado pela ligação de Fas com seu ligante FasL, seguido pela ação de caspases que desencadeiam uma cascata de reações que levam à fragmentação do DNA da célula (KAVURMA; KHACHIGIAN, 2003). Huang *et al.* (1998) mostraram que, quando comparados a camundongos selvagens, camundongos que não expressam o gene Fas (MRP/lpr) são incapazes de controlar a infecção por *L. (L.) major*, ainda que ocorra a produção de IL-12, desenvolvimento de resposta Th1 e maior síntese de NO. Conforme os autores, macrófagos de MRP/lpr infectados pelo parasito mostram pouca ou nenhuma apoptose quando incubados com anticorpo anti-Fas. Um estudo posterior, no entanto, detectou que macrófagos esplênicos humanos infectados *in vitro* com *L. (L.) donovani* expressam mais Fas em sua superfície quando

comparados a macrófagos não infectados. Este foi um resultado interessante visto que linfócitos T ativados expressam FasL em sua superfície e podem se ligar aos macrófagos por meio de Fas, induzindo, assim a eliminação destes. No entanto, no curso natural da LV não há cura espontânea e as células infectadas pelo parasito tendem a não ser eliminadas (EIDSMO *et al.*, 2002).

Uma segunda proteína com abundância diminuída em macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* e que estava envolvida com produção de IL-1 β , resposta imune inata e resposta inflamatória (Figura 20) foi a proteína adaptadora Pycard (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*), também chamada de Asc. Juntamente com receptores NLRs, Pycard compõe os complexos proteicos denominados inflamassomas, implicados no sistema imune inato. Quando o complexo Nlrp3-Pycard é formado, ocorre a ativação da Caspase-1 que, por sua vez, promove a clivagem das citocinas pró-inflamatórias da família IL-1 nas suas formas bio-ativas: IL-1 β e IL-18 (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009). O estudo de Lima-Junior *et al.* (2013) confirma o papel desta proteína na modulação e inibição da ativação do inflamassoma em macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados por *L. (L.) amazonensis*. Ao infectar macrófagos *in vitro* com esta espécie, os autores demonstraram a ocorrência da ativação de Caspase 1 e secreção de IL-1 β , o que não aconteceu na infecção de macrófagos obtidos de camundongos Pycard^{-/-} e Casp1^{-/-}. Nestes últimos casos, as células foram suscetíveis ao parasito. Os mesmos resultados foram observados ao avaliar a infecção *in vivo*, uma vez que o tamanho das lesões e a carga parasitária foram mais elevadas em animais Pycard^{-/-} e Casp1^{-/-}.

Myd88 (*Myeloid differentiation primary response protein* Myd88) é outra interessante proteína que se mostrou regulada negativamente em macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* e que está associada à resposta inflamatória e resposta imune inata (Figura 20). Myd88 é uma proteína adaptadora com papel central na via inflamatória, visto que promove a ligação de receptores IL-1R ou do tipo *Toll* (TLRs - *Toll Like Receptors*), presentes na superfície dos macrófagos, com proteínas quinases associadas a IL-1R. Como consequência, ocorre ativação de NF κ B e produção de citocinas como IL-1 e IL-18, importantes no desenvolvimento da resposta Th1 (DEGUINE; BARTON, 2014; TUON *et al.*, 2008). A importância desta proteína na via de sinalização da qual participa na infecção por *Leishmania* pode ser constatada através das investigações de Debus *et al.* (2003) e Veer *et al.* (2003), nos quais camundongos deficientes de Myd88 se mostraram altamente suscetíveis a *L. (L.) major*, ocorrendo polarização da resposta imune para o perfil Th2 dependente de IL-4. Macrófagos de

camundongos Myd88^{-/-} também não resistem à infecção por *L. (L.) amazonensis* e na infecção *in vivo* os animais exibem lesões e carga parasitária maiores que as que de camundongos C56BL/6 controle (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013).

Os resultados encontrados parecem estar em concordância com o que se conhece sobre a linhagem de camundongos utilizada nos experimentos deste trabalho. Balb/C é reconhecida pela alta suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis*, desenvolvendo uma resposta imune predominantemente do tipo Th2. Nestes animais, a doença progride para uma fase crônica, ocorrendo a disseminação do parasito (AFONSO; SCOTT, 1993; LOEUILLET; BAÑULS; HIDE, 2016; ROLÃO; MELO; CAMPINO, 2004). Em contrapartida, camundongos da linhagem Balb/C são capazes de controlar a doença visceral causada por *L. (L.) infantum*, embora nem sempre o parasito seja completamente eliminado. Nestes animais é observado o desenvolvimento de imunidade órgão-específica, visto que no fígado, por exemplo, o parasito multiplica-se rapidamente nos momentos iniciais da infecção, mas é eliminado por mecanismos da resposta Th1. Em contrapartida, *Leishmania* pode persistir por longo tempo no baço, mas sua replicação é mantida sob controle (ROLÃO *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 1996).

3.4 Ciclo celular

Na análise do KEGG das proteínas reguladas simultaneamente em macrófagos infectados por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, somente as proteínas que apresentaram abundância reduzida em ambos os grupos estavam envolvidas com vias enriquecidas (Figura 21). Ciclo celular foi a via com enriquecimento mais significativo e cinco proteínas estavam associadas a ela: Ep300 (*E1A binding protein p300*), Smad4 (*SMAD family member 4*), Anapc13 (*anaphase promoting complex subunit 13*), Cdk6 (*cyclin-dependent kinase 6*) e Mcm6 (*minichromosome maintenance complex component 6*) (Figura 22). Cdk6 ativa o ciclo celular ao interagir com ciclinas, no início da fase G1 do ciclo. A formação do complexo leva a uma cascata de eventos que culmina na ativação da transcrição de genes necessários para a replicação do DNA (GROSSEL; HINDS, 2006). Ep300 participa de diversos eventos celulares, incluindo regulação do ciclo celular, síntese de DNA e diferenciação celular. Ela atua como molécula co-ativadora da transcrição, sendo crucial na ativação e regulação do fator de transcrição nuclear p53, o qual tem função pró-apoptótica (GROSSMAN, 2001; OZAKI; NAKAGAWARA, 2011). Smad4 pertence a uma família de proteínas transdutoras de sinal que são fosforiladas e ativadas por quinases transmembrana em resposta à sinalização de TGF- β . A

via de sinalização TGF- β /Smad4 é responsável por diversos processos celulares, tais como proliferação, diferenciação, apoptose e migração (ZHAO; MISHRA; DENG, 2018). Mcm6 é uma helicase essencial para a iniciação da replicação do DNA, pois atua abrindo a estrutura de dupla hélice no ponto de origem da replicação (UZCANGA *et al.*, 2017). Por fim, a Anapc13 é uma subunidade de um complexo de ubiquitina ligase que catalisa a ubiquitinação de reguladores do ciclo celular, marcando-os para proteólise pelo proteossoma. Assim, esta proteína regula a progressão do ciclo celular (SCHWICKART *et al.*, 2004).

Os indícios encontrados neste trabalho levam a acreditar que a infecção por ambas as espécies de *Leishmania* aqui estudadas influenciam o ciclo celular da célula hospedeira, retardando-o. Aumentando a sobrevivência da célula o parasito tem mais tempo para se multiplicar em seu interior.

3.5 Via de sinalização Ras

A via Ras é uma essencial cascata de transdução de sinal do ambiente extracelular para o núcleo da célula, onde genes específicos são ativados para regulação de numerosos processos, tais como adesão celular, progressão do ciclo celular, migração e sobrevivência da célula, diferenciação, metabolismo, proliferação e transcrição (MOLINA; ADJEI, 2006). Na análise de enriquecimento de vias pelo KEGG, esta via se mostrou significativamente enriquecida entre as proteínas exclusivamente mais abundantes em M ϕ _Li (Figura 21), contando com o envolvimento das seguintes proteínas: Bcl2l1, Brap, Mapk3, Nfkb1, Pak2 e Pak3 (Figura 23). Mapk3, também chamada de Erk1 participa da cascata de eventos que ocorre após ativação da proteína Ras na membrana plasmática. Quando ativada, ela promove fosforilação de diversos substratos no citoplasma e núcleo da célula, incluindo fatores de transcrição e proteínas quinases (ROSKOSKI JR, 2012). Em macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis*, a fosforilação da cromatina no promotor de IL-10 e subsequente ligação do fator de transcrição a este promotor dependem da ativação de Erk, e a produção de IL-10 induz a diferenciação de linfócitos para o tipo Th2. Além disso, esta proteína tem participação no controle da infecção por animais infectados, uma vez que lesões progridem mais lentamente e com número reduzido de parasitos quando sua atividade é inibida (YANG, Z.; MOSSER; ZHANG, 2007). Martinez e Petersen (2014) também observaram associação entre a persistência parasitária e diminuição de IL-12 quando ocorre ativação de Erk1 por *L. (L.) amazonensis*.

Nfkb1 é membro da família de fatores de transcrição NF- κ B, sendo uma subunidade composta pela proteína precursora p105 (aumentada no presente trabalho) que, após processamento, origina p50 (CARTWRIGHT; PERKINS; WILSON, 2016). Esta família é conhecida por regular a expressão de genes da resposta imune envolvidos na imunidade contra patógenos, assim como nos processos apoptóticos. Alguns trabalhos mostram que em camundongos deficientes em Nfkb1, ocorre a redução da proliferação de células T e produção de citocinas características do perfil de resposta do tipo Th2 (ARTIS *et al.*, 2002; DAS *et al.*, 2001). Quando infectados por *L. (L.) major*, camundongos *knockout* para Nfkb1 se mostram suscetíveis, desenvolvendo lesões crônicas com persistência parasitária (ARTIS *et al.*, 2003).

Pak2 e Pak 3 são proteínas quinases cuja atividade é estimulada pela ligação das GTPases Rac e CDC42. As funções celulares das PAKs são amplas, incluindo sobrevivência da célula, organização do citoesqueleto, progressão do ciclo celular (BOKOCH, 2003).

Bcl211, ou Bcl-xL, é uma proteína anti-apoptótica que previne a liberação de citocromo C pelas mitocôndrias, impedindo a ativação de caspases e consequente apoptose (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004). A transcrição de Bcl-xL se dá como resultado da ativação de NF- κ B, o que ocorre em resposta à infecção por *Leishmania* (CHEN *et al.*, 2000; RUHLAND; LEAL; KIMA, 2007). De fato, Nfkb1 se mostrou aumentada neste grupo, como citado anteriormente. O aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas é um mecanismo empregado por *Leishmania* para inibir a apoptose, como demonstrado por (DONOVAN *et al.*, 2009), cujo estudo mostrou o aumento da expressão de Bcl-xL em macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264.7 infectados com diferentes cepas de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani*. Segundo Rodríguez-González, Wilkins-Rodríguez e Gutiérrez-Kobeh (2018), a infecção com *L. (L.) mexicana* diminui a concentração de ROS e induz o aumento dos níveis de Bcl-xL em células dendríticas tratadas com BSO (um inibidor da síntese de glutatona, o mais importante regulador da concentração de ROS) e camptotecina (um indutor da apoptose).

O aumento desse grupo de proteínas exemplifica um pouco a complexidade da resposta imune de Balb/C frente à infecção por *L. (L.) infantum*, a qual se mostra órgão específica. Enquanto o aumento de Erk1 e Bcl-xL sugere tendência da célula em desenvolver resposta Th2, não controlando a multiplicação do parasito, e em atrasar a apoptose celular, a maior abundância de Nfkb1 pode levar à inibição da resposta Th2 e consequente controle da infecção.

3.6 Fagossomo

O fagossomo consiste é um compartimento intracelular delimitado pela membrana celular, onde se encontram microrganismos que foram fagocitados pela célula. O fagossomo tem a função de promover a morte e degradação de patógenos, mas, para tal, necessita passar por processos de maturação que envolvem fusão com endossomos e lisossomos (JUTRAS; DESJARDINS, 2005). Sete proteínas reguladas negativamente somente em macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* estavam associadas a esta via, sendo elas: Atp6v1f (*ATPase, H⁺ transporting, lysosomal VI subunit F*), Atp6v1g1 (*ATPase, H⁺ transporting, lysosomal VI subunit G1*), Sec61a1 (*Sec61 alpha 1 subunit*), Canx (*calnexin*), Dync1li1 (*dynein cytoplasmic 1 light intermediate chain 1*), Ncf2 (*neutrophil cytosolic factor 2*) e Tubb5 (*tubulin, beta 5 class I*) (Figura 24). Atp6v1f e Atp6v1g1 são subunidades da enzima ATPase vacuolar, a qual, dentre outras funções biológicas, transloca H⁺ para o lúmen do fagossomo e o acidificam. Os macrófagos dependem da ação destas enzimas para manter a acidez do pH no interior de fagossomos, o que é essencial para a atividade de moléculas de degradação nesses compartimentos (PAMARTHY *et al.*, 2018). Os fagossomos também podem concentrar espécies reativas de oxigênio para destruir patógenos, o que é feito pelo complexo enzimático NADPH oxidase, do qual a Ncf2 participa. Este complexo se localiza na membrana do fagossomo e realiza o transporte de elétrons para oxigênio molecular, gerando o radical superóxido (O₂⁻) (URIBE-QUEROL; ROSALES, 2017). Calnexina (Canx) é uma proteína do retículo endoplasmático, mas Ndjamen *et al.* (2010) mostraram que *L. (L.) donovani* e *L. (L.) pifanoi* a recrutam para a membrana dos vacúolos parasitóforos de macrófagos infectados, o que também parece ocorrer com Sec61.

A diminuição de proteínas do fagossomo pode favorecer a replicação de *Leishmania* e talvez estar associada à maior quantidade de amastigotas comumente visualizadas em células de Balb/C infectadas por *L. (L.) amazonensis* quando comparadas com células de camundongos de outras linhagens, como C3/He (PEREIRA, 2015).

4 CONCLUSÕES

O presente estudo representa uma tentativa de compreender, por meio de uma perspectiva proteômica, aspectos da interação de macrófagos peritoneais murinos quando infectados com distintas espécies de *Leishmania*. Tendo em vista os aspectos abordados, pode-se concluir que:

- a) Embora Balb/C seja uma linhagem mais suscetível à *L. (L.) amazonensis*, nas primeiras 72 h de infecção *in vitro* não é observada diferença significativa no índice de infecção de macrófagos infectados por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*;
- b) Alguns mecanismos de resposta da célula hospedeira são comumente induzidos pela infecção por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*. Porém, proteínas exclusivamente reguladas em cada uma destas espécies podem estar envolvidas com os diferentes fenótipos observados no hospedeiro infectado;
- c) *Leishmania* parece inibir mecanismos de apoptose no macrófago, o que pode ser devido à necessidade de viabilizar sua sobrevivência e replicação na célula;
- d) Em virtude de alterações epigenéticas na célula hospedeira, como a trimetilação de diferentes resíduos de lisina da histona H3, a transcrição gênica pode estar sendo afetada pela infecção por *Leishmania*;
- e) A transcrição de genes pode estar ativada em macrófagos infectados por *L. (L.) infantum*, nos quais foi verificado o enriquecimento do processo de desmetilação de DNA;
- f) A infecção por *L. (L.) infantum* parece ativar a resposta imune adaptativa por meio do aumento de proteínas envolvidas na apresentação de antígenos via MHC de classe I, como Tap1 e Erap1;
- g) A persistência de *L. (L.) amazonensis* na célula hospedeira pode ser explicada pela regulação negativa de proteínas que participam da acidificação do fagossomo e geram moléculas antioxidantes importantes na destruição do parasito;
- h) A diminuição do processo inflamatório, nos quais proteínas como Pycard e Myd88 estão envolvidas, também parece ser mecanismo de evasão por meio do qual *L. (L.) amazonensis* garante sua permanência na célula hospedeira.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, C. *et al.* Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *International Journal of Plant Genomics*, p. 1–17, 2012.
- AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune Responses Associated with Susceptibility of C57BL / 10 Mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, v. 61, n. 7, p. 2952–2959, 1993.
- AGA, E. *et al.* Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, v. 169, n. 2, p. 898–905, 2002.
- AIKAWA, M. *et al.* Interactions between macrophagelike cells and *Leishmania braziliensis* in vitro. *The American journal of pathology*, v. 108, n. 1, p. 50–9, 1982.
- AKARID, K. *et al.* *Leishmania major* -mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c . *Journal of Leukocyte Biology*, v. 76, n. 1, p. 95–103, 2004.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- ALEIXO, J. A. *et al.* Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, n. 1, p. 79–82, 2006.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, 2012.
- ANDRADE-NARVAEZ, F. J. *et al.* Asymptomatic infection with American cutaneous leishmaniasis: Epidemiological and immunological studies. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 10, p. 599–604, 2016.
- ANTOINE, J. C. *et al.* The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends in Microbiology*, v. 6, n. 10, p. 392–401, 1998.
- ARAÚJO-SANTOS, J. M. *et al.* The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 330, n. 1, p. 349–355, 2005.
- ARTIS, D. *et al.* Differential Requirement for NF- κ B Family Members in Control of Helminth Infection and Intestinal Inflammation. *The Journal of Immunology*, v. 169, p. 4481–4487, 2002.
- ARTIS, D. *et al.* NF- κ B1 Is Required for Optimal CD4 + Th1 Cell Development and Resistance to *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, v. 170, p. 1995–2003, 2003.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, v. 30, n. 12–13, p. 1269–1281, 2000.
- BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology*, v. 64, 2007.
- BARBOSA, E. B. *et al.* Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 58, n. 3, p. 366–375, 2012.
- BARRAL, A. *et al.* Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of american visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 35, n. 4, p. 732–34, 1986.

- BARRAL, A. *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 44, n. 5, p. 536–46, 1991.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.
- BATES, P.; ROGERS, M. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*, v. 4, n. 6, p. 601–609, 2004. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1566-5240&volume=4&issue=6&page=601>>.
- BELLE, E. A. Cultivation of *Leishmania donovani* in human amnion epithelial cell tissue cultures: a preliminary report. *Canadian Medical Association Journal*, v. 79, p. 726–728, 1958.
- BELO, V. S. *et al.* Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 4, 2013.
- BILBE, G. Overcoming neglect of kinetoplastid diseases. *Science*, v. 348, n. 6238, p. 974–976, 2015.
- BITTENCOURT, A. *et al.* In situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 84, n. 4, p. 585–586, 1989. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761989000400022&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.
- BLUM, J. S.; WEARSCH, P. A.; CRESSWELL, P. Pathways of Antigen Processing. *Annual Review of Immunology*, v. 30, n. 1, p. 311–328, 2013.
- BOGDAN, C. *et al.* Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine*, v. 191, p. 2121–2129, 2000.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitology Today*, v. 15, n. 1, p. 22–28, 1999.
- BOKOCH, G. M. Biology of the p21-activated kinases. *Annual Review of Biochemistry*, v. 72, p. 743–781, 2003.
- BRASIL. *Guia de vigilância em saúde*. [S.l: s.n.], 2017. v. 2.
- BRASIL. *Leishmaniose Visceral*. [S.l: s.n.], 2014.
- BRASIL. *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana*. [S.l: s.n.], 2010.
- BROTHERTON, M. C. *et al.* Analysis of membrane-enriched and high molecular weight proteins in *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. *Journal of Proteome Research*, v. 11, n. 8, p. 3974–3985, 2012.
- BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. General Suppression of Macrophage Gene Expression During *Leishmania donovani* Infection. *The Journal of Immunology*, v. 166, n. 5, p. 3416–3422, 2001. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.166.5.3416>>.
- CALDART, E. T. *et al.* *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, v. 26, p. 17–27, 2017.
- CAMARA COELHO, L. I. *et al.* Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitology Research*, v. 108, n. 3, p. 671–677, 2011.
- CARDOSO, R. M. *et al.* Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. *Parasites and Vectors*, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2015.
- CARNIELLI, J. B. T. *et al.* Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant *Leishmania infantum* chagasi isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes. *Journal of Proteomics*, v. 108, p. 198–208, 2014.

- CARPENTER, E. P. *et al.* Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 18, n. 5, p. 581–586, 2008.
- CARTWRIGHT, T.; PERKINS, N. D.; WILSON, C. L. NF κ B1 : a suppressor of inflammation , ageing and cancer. v. 283, p. 1812–1822, 2016.
- CAVALCANTE-COSTA, V. S. *et al.* Leishmania amazonensis hijacks host cell lysosomes involved in plasma membrane repair to induce invasion in fibroblasts. *Journal of Cell Science*, v. 132, 2019.
- CHANG, C. S.; CHANG, K. P. Monoclonal antibody affinity purification of a Leishmania membrane glycoprotein and its inhibition of leishmania-macrophage binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 83, n. 1, p. 100–104, 1986. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.83.1.100>>.
- CHANG, K.; DWYER, D. Multiplication of a human parasite (Leishmania donovani) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science*, v. 193, n. 4254, p. 678–680, 1976. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.948742>>.
- CHAUSSABEL, D. *et al.* Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. v. 102, n. 2, p. 672–681, 2003.
- CHEN, C. *et al.* The Rel / NF- κ B Family Directly Activates Expression of the Apoptosis Inhibitor Bcl-x L. *Molecular and Cellular Biology*, v. 20, n. 8, p. 2687–2695, 2000.
- COELHO, A. C.; COTRIM, P. C. The role of ABC transporters in drug-resistant Leishmania. In: PONTE-SUCRE, A.; PADRÓN-NIEVES, M. (Org.). *Drug Resistance in Leishmania Parasites*. [S.l.]: Springer, Cham, 2018. .
- CONSTANTINO, C. *et al.* Seroepidemiology of Leishmania spp. in dogs residing in Telêmaco Borba, Paraná, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 6, p. 3181–3190, 2014.
- COSTA, M. M. *et al.* Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. *Journal of proteome research*, v. 10, n. 5, p. 2172–2184, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21355625>>.
- COURRET, N. *et al.* Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *Journal of cell science*, v. 115, n. Pt 11, p. 2303–16, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12006615>>.
- CUERVO, P. *et al.* Proteome analysis of Leishmania (Viannia) braziliensis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 154, n. 1, p. 6–21, 2007.
- DA SILVA, A. I. *et al.* In Vitro Metacyclogenesis of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to Human Macrophages. v. 2015, p. 1–15, 2015.
- DAS, J. *et al.* A critical role for NF- κ B in Gata3 expression and TH 2 differentiation in allergic airway inflammation. v. 2, n. 1, 2001.
- DE LIMA CELESTE, J. L. *et al.* Experimental mixed infection of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (L.) infantum in hamsters (Mesocricetus auratus). *Parasitology*, n. May, p. 1–12, 2017.
- DE MENDONÇA, S. C. F.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; MATOS, D. C. DE S. Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in Leishmania. *Frontiers in Immunology*, v. 6, n. OCT, p. 1–6, 2015.
- DE OLIVEIRA, J. P. *et al.* Genetic diversity of Leishmania amazonensis strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid*

Biology and Disease, v. 6, n. Lcl, p. 1–8, 2007.

DE SOUZA, A. I. *et al.* Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 128, n. 1–2, p. 41–45, 2005.

DEAN, S. *et al.* A surface transporter family conveys the trypanosome differentiation signal. v. 459, n. 7244, p. 213–217, 2009.

DEBUS, A. *et al.* High Levels of Susceptibility and T Helper 2 Response in MyD88-Deficient Mice Infected with *Leishmania major* Are Interleukin-4 Dependent. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 12, p. 7215–7218, 2003.

DEGUINE, J.; BARTON, G. M. MyD88: a central player in innate immune signaling. v. 7, n. November, p. 1–7, 2014.

DEVAULT, A.; BÃAULS, A. L. The promastigote surface antigen gene family of the *Leishmania* parasite: Differential evolution by positive selection and recombination. *BMC Evolutionary Biology*, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2008.

DIAS, E. S. *et al.* Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 176, n. 2–3, p. 101–111, 2011.

DONOVAN, M. J. *et al.* Experimental Parasitology *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Experimental parasitology*, v. 123, p. 58–64, 2009.

DOS SANTOS, S. O. *et al.* Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 12, n. 3, p. 315–317, 1998.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* survival in the macrophage: Where the ends justify the means. *Current Opinion in Microbiology*, v. 26, p. 32–40, 2015.

DVORAK, V.; SHAW, J.; VOLF, P. Parasite Biology: The Vectors. In: BRUSCHI, F.; GRADONI, L. (Org.). *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*. [S.l.]: Springer, Cham, 2018. p. 31–77.

EIDSMO, L. *et al.* Alteration of Fas and Fas ligand expression during human visceral leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 130, n. 2, p. 307–313, 2002.

EISENHABER, B.; BORK, P. Sequence properties of GPI-anchored proteins near the ω -site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. v. 11, n. 12, p. 1155–1161, 1998.

ERBA, H. P. *et al.* Structure, chromosome location, and expression of the human gamma-actin gene: differential evolution, location, and expression of the cytoskeletal beta- and gamma-actin genes. *Molecular and Cellular Biology*, v. 8, n. 4, p. 1775–1789, 1988.

FIALHO JR, L. C. *Proteoma Quantitativo para Identificação de Potenciais Fatores de Virulência em Leishmania infantum*. 2017. 1-166 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

FRANCIS, N. J.; KINGSTON, R. E.; WOODCOCK, C. L. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science*, v. 306, n. 5701, p. 1574–1577, 2004.

FYODOROV, D. V. *et al.* Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 19, n. 3, p. 192–206, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29018282>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5897046>>.

GARCIA-GARCIA, J. C. *et al.* Epigenetic silencing of host cell defense genes enhances intracellular survival of the rickettsial pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 6, p. 1–10, 2009.

GOMES, A. P. *et al.* Visceral Leishmaniasis: A Brazilian Perspective. *Journal of Tropical Diseases*, v. 04, n. 02, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<http://www.esciencecentral.org/journals/visceral->

leishmaniasis-a-brazilian-perspective-2329-891X-1000202.php?aid=69769>.

GOMES, I. N. *et al.* Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes and Infection*. [S.l.: s.n.], 2003

GONÇALVES, R.; MOSSER, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current Protocols in Immunology*, n. SUPPL. 83, p. 1–16, 2015.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2004000300011&lng=pt&tlng=pt>.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, n. 3, p. 230–250, 1993.

GROSSEL, M. J.; HINDS, P. W. Beyond the cell cycle: A new role for cdk6 in differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 97, n. 3, p. 485–493, 2006.

GROSSMAN, S. R. p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *European Journal of Biochemistry*, v. 268, n. 10, p. 2773–2778, 2001.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, v. 18, n. 8, p. 332–334, 2002.

HARI DASS, S. A.; VYAS, A. Toxoplasma gondii infection reduces predator aversion in rats through epigenetic modulation in the host medial amygdala. *Molecular Ecology*, v. 23, n. 24, p. 6114–6122, 2014.

HASSANI, K.; OLIVIER, M. Immunomodulatory Impact of *Leishmania*-Induced Macrophage Exosomes: A Comparative Proteomic and Functional Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 5, 2013.

HEUSSLER, V. T.; KÜENZI, P.; ROTTENBERG, S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 1166–1176, 2001.

HOFFMANN, A. R. *et al.* *Leishmania amazonensis* em cão com quadro clínico de leishmaniose visceral no Estado do Paraná, Brasil - Relato de caso. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. SUPPL2, p. 3265–3270, 2012.

HORTON, P. *et al.* WoLF PSORT : protein localization predictor. v. 35, n. 17, p. 585–587, 2007.

HORVATÍĆ, A. *et al.* High-throughput proteomics and the fight against pathogens. *Molecular BioSystems*, v. 12, n. 8, p. 2373–2384, 2016. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6MB00223D>>.

HSIAO, C. H. C. *et al.* The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 157, n. 2, p. 148–159, 2008.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. 1, p. 1–13, 2009a.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, v. 4, n. 1, p. 44–57, 2009b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131956>>.

HUANG, F.-P. *et al.* Cutting Edge: Mice Defective in Fas Are Highly Susceptible to *Leishmania* major Infection Despite Elevated IL-12 Synthesis, Strong Th1 Responses, and Enhanced Nitric Oxide

- Production. *The Journal of Immunology*, v. 160, p. 4143–4147, 1998.
- JAIN, R. *et al.* Leishmania cell surface prohibitin: Role in host-parasite interaction. *Cellular Microbiology*, v. 12, n. 4, p. 432–452, 2010.
- JOSHI, P. B. *et al.* Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 120, n. 1, p. 33–40, 2002.
- JUTRAS, I.; DESJARDINS, M. Phagocytosis : At the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental*, v. 21, p. 511–527, 2005.
- KALASHNIKOVA, A. A.; ROGGE, R. A.; HANSEN, J. C. Biochimica et Biophysica Acta Linker histone H1 and protein – protein interactions ☆. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1859, n. 3, p. 455–461, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.10.004>>.
- KARAGIANNIS-VOULES, D. A. *et al.* Bayesian Geostatistical Modeling of Leishmaniasis Incidence in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 5, 2013.
- KAVURMA, M. M.; KHACHIGIAN, L. M. Signaling and transcriptional control of Fas ligand expression. *Cell Death and Differentiation*, v. 10, n. 1, p. 36–44, 2003.
- KUMAR, A. *et al.* Proteomic analyses of membrane enriched proteins of Leishmania donovani Indian clinical isolate by mass spectrometry. *Parasitology International*, v. 64, n. 4, p. 36–42, 2015a.
- KUMAR, A. *et al.* Proteomic analyses of membrane enriched proteins of Leishmania donovani Indian clinical isolate by mass spectrometry. *Parasitology International*, v. 64, n. 4, p. 36–42, 2015b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2015.01.004>>.
- LACERDA, D. I. *et al.* Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with leishmania amazonensis in murine macrophages. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 2, p. 238–245, 2012.
- LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species : a brief historical review of their discovery , ecology and taxonomy. v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.
- LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The leishmaniases in biology and medicine. Academic Press; 1987.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *British medical bulletin*, v. 28, n. 1, p. 44–8, 1972. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4562681>>.
- LANG, C. *et al.* Impaired Chromatin Remodelling at STAT1-Regulated Promoters Leads to Global Unresponsiveness of Toxoplasma gondii-Infected Macrophages to IFN- c. v. 8, n. 1, 2012.
- LANG, T. *et al.* Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with Leishmania amazonensis. *J Cell Sci*, v. 107 (Pt 1), p. 69–82, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8175924>.
- LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.
- LEOPOLD WAGER, C. M. *et al.* IFN- γ immune priming of macrophages in vivo induces prolonged STAT1 binding and protection against Cryptococcus neoformans. *PLoS Pathogens*, v. 14, n. 10, p. 1–27, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1007358>>.
- LIMA-JUNIOR, D. S. *et al.* Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide – mediated resistance to Leishmania. n. June, 2013.
- LINCOLN, L. M. *et al.* Genetic complementation of Leishmania deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 137, n. 1, p. 185–189,

2004.

LISI, S. *et al.* Infection with *Leishmania infantum* inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 52, n. 3, p. 211–217, 2005.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, n. June, p. 1–8, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00083/abstract>>.

LOEUILLET, C.; BAÑULS, A.; HIDE, M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice : experimental considerations. *Parasites & Vectors*, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1413-9>>.

LYNN, M. A.; MARR, A. K.; MCMASTER, W. R. Differential quantitative proteomic profiling of *Leishmania infantum* and *Leishmania mexicana* density gradient separated membranous fractions. *Journal of Proteomics*, v. 82, p. 179–192, 2013b.

MAGALHÃES, R. D. M. *et al.* Identification of Differentially Expressed Proteins from *Leishmania amazonensis* Associated with the Loss of Virulence of the Parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 4, p. e2764, 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002764>>.

MARR, A. K. *et al.* *Leishmania donovani* Infection Causes Distinct Epigenetic DNA Methylation Changes in Host Macrophages. v. 10, n. 10, 2014.

MARTINEZ, P. A.; PETERSEN, C. A. Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms. *Immunologic Research*, v. 59, p. 153–165, 2014.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes : Guardians of the Body. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 229–265, 2009.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, v. 16, n. 5, p. 188–189, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169475800016379>>.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *Qjm*, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MCMASTER, W. R.; MORRISON, C. J.; KOBOR, M. S. Epigenetics: A New Model for Intracellular Parasite-Host Cell Regulation. *Trends in Parasitology*, v. 32, n. 7, p. 515–521, 2016.

MELO-BRAGA, M. N. *et al.* Comprehensive Quantitative Comparison of the Membrane Proteome, Phosphoproteome, and Sialome of Human Embryonic and Neural Stem Cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 13, n. 1, p. 311–328, 2014. Disponível em: <<http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M112.026898>>.

MEMBRIVE, N. A. *et al.* Environmental and Animal Characteristics as Factors Associated with American Cutaneous Leishmaniasis in Rural Locations with Presence of Dogs, Brazil. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, p. 1–8, 2012.

MENEZES, J. P. B. *et al.* Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. *Microbes and Infection*, v. 15, n. 8–9, p. 579–591, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2013.04.005>>.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 63, n. 2, p. 309–322, 2010.

MOLINA, J. R.; ADJEI, A. A. The Ras / Raf / MAPK Pathway. *Journal of Thoracic Oncology*, v. 1, n. 1, p. 7–19, 2006.

MONERRI, N. C. S. DE; KIM, K. Pathogens Hijack the Epigenome A New Twist on Host-Pathogen

- Interactions. *The American Journal of Pathology*, v. 184, n. 4, p. 897–911, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.12.022>>.
- NDJAMEN, B. *et al.* Leishmania parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell 's endoplasmic reticulum ; parasitophorous vacuoles are. *Cellular Microbiology*, v. 12, n. 10, p. 1480–1494, 2010.
- NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar americana nas américas. *Revista Percurso*, v. 1 (1), p. 85–103, 2009.
- NEUBER, H. Leishmaniasis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 6, n. 9, p. 754–765, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1610-0387.2008.06809.x>>.
- NEUHOFF, V. *et al.* Dependence of Particle and Fiber Properties. *Electrophoresis*, v. 9, p. 255–262, 1988.
- O'FARRELL, P. H. High Resolution of Proteins * Electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 250, n. 10, p. 4007–4021, 1975. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/250/10/4007.short>>.
- OLIVEIRA-NETO, M. P. *et al.* An outbreak of american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. . [S.l: s.n.]. , 1988
- OSTYN, B. *et al.* Incidence of symptomatic and asymptomatic *Leishmania donovani* infections in High-Endemic foci in India and Nepal: A prospective study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 10, p. 1–7, 2011.
- OVERINGTON, J.; AL-LAZIKANI, B.; HOPKINS, A. How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, p. 993–996, 2006.
- OZAKI, T.; NAKAGAWARA, A. Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers*, v. 3, n. 1, p. 994–1013, 2011.
- PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds : Unveiled similarities and differences Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds : unveiled similarities and differences. v. 28, n. SEPTEMBER, p. 531–538, 2012.
- PAMARTHY, S. *et al.* The curious case of vacuolar ATPase : regulation of signaling pathways. *Molecular Cancer*, v. 17, n. 41, p. 1–9, 2018.
- PARODI-TALICE, A. *et al.* The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1612, n. 2, p. 195–207, 2003.
- PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int J Infect Dis*, v. 14, n. 12, p. e1032-9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952234>>.
- PENG, J.; GYGI, S. P. Proteomics: the move to mixtures. *Journal of mass spectrometry : JMS*, v. 36, n. 10, p. 1083–91, out. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11747101>>. Acesso em: 30 jan. 2014.
- PEREIRA, S. S. *Suscetibilidade vs resistência: estudo da infecção por Leishmania (Leishmania) amazonensis em macrófagos murinos*. 2015. Instituto Oswaldo Cruz, 2015.
- PETERS, N. C. *et al.* In Vivo Imaging Reveals an Essential. *Science*, v. 321, n. December, p. 970–975, 2008.
- PETERSEN, T. N. *et al.* correspondence SignalP 4 . 0 : discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.
- PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. v. 1644, p. 83–94, 2004.

- PION, M. *et al.* HIV infection of human regulatory T cells downregulates Foxp3 expression by increasing DNMT3b levels and DNA methylation in the FOXP3 gene. *AIDS*, v. 27, n. January 2013, p. 2019–2029, 2013.
- PIRES, S. F. *et al.* Identification of virulence factors in leishmania infantum strains by a proteomic approach. *Journal of Proteome Research*, v. 13, n. 4, p. 1860–1872, 2014.
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.14.103>>.
- PORTEUS, B. *et al.* Utility of gel-free, label-free shotgun proteomics approaches to investigate microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 2, p. 407–416, 2011.
- PROBST, C. M. *et al.* A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to *Leishmania amazonensis* infection. *BMC Microbiology*, v. 12, p. 1–12, 2012.
- RANDOW, F.; SEED, B. Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nature Cell Biology*, v. 3, n. 10, p. 891–896, 2001.
- RASTROJO, A. *et al.* Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 8, n. 2, p. 246–264, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.04.002>>.
- READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance*, v. 15, n. 10, p. 29–39, 2010.
- REAL, F. *et al.* Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cellular Immunology*, v. 16, p. 1549–1564, 2014.
- RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-Host-Cell Interaction: Complexities and Alternative Views. *Parasitology Today*, v. 16, p. 292–297, 2000.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J.; WILKINS-RODRÍGUEZ, A. A.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L. Role of glutathione, ROS, and Bcl-xL in the inhibition of apoptosis of monocyte-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* promastigotes. *Parasitology Research*, v. 117, p. 1225–1235, 2018.
- RODRIGUEZ, N. E.; CHANG, H. K.; WILSON, M. E. Novel Program of Macrophage Gene Expression Induced by Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 4, p. 2111–2122, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=375188&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- ROLÃO, N. *et al.* *Leishmania infantum*: Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, v. 115, n. 3, p. 270–276, 2007.
- ROLÃO, N.; MELO, C.; CAMPINO, L. Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, v. 90, p. 123–126, 2004.
- ROSKOSKI JR, R. ERK1 / 2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, v. 66, p. 105–143, 2012.
- RUHLAND, A.; LEAL, N.; KIMA, P. E. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cellular Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 84–96, 2007.
- SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, v. 69, n. 1, p. 100–103, 1989.
- SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by. *Allergy*, v. 3, n. 11, p. 1041–1047, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407413>>.

- SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 120, p. 1–21, 2002.
- SANCHES, L. DA C. *et al.* Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 25, n. 4, p. 465–469, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612016000400465&lng=en&tlng=en>.
- SARDAR, A. H. *et al.* Proteome changes associated with *Leishmania donovani* Q3 promastigote adaptation to oxidative and nitrosative stresses. v. 81, n. Cnpn 2012, p. 2012–2015, 2013.
- SAUVAGE, V. *et al.* The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 167, n. 2, p. 81–94, 2009.
- SCHWICKART, M. *et al.* Swm1/Apc13 Is an Evolutionarily Conserved Subunit of the Anaphase-Promoting Complex Stabilizing the Association of Cdc16 and Cdc27. *Molecular and Cellular Biology*, v. 24, n. 8, p. 3562–3576, 2004.
- SERAFIM, T. D. *et al.* Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature Microbiology*, v. 3, n. 5, p. 548–555, 2018.
- SILVA-ALMEIDA, M. *et al.* Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasites and Vectors*, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2012.
- SILVA, E. A. *et al.* Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Experimental Parasitology*, v. 119, n. 3, p. 343–348, 2008.
- SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. 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, n. 3, p. 239–251, 2004.
- SINCLAIR, J. *et al.* Profiling signatures of ovarian cancer tumour suppression using 2D-DIGE and 2D-LC-MS/MS with tandem mass tagging. *Journal of Proteomics*, v. 74, n. 4, p. 451–465, 2011.
- SINGH, A. K. *et al.* Proteomic-based approach to gain insight into reprogramming of THP-1 cells exposed to *Leishmania donovani* over an early temporal window. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 5, p. 1853–1868, 2015.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.
- SUDA, T. *et al.* Molecular Cloning and Expression of the Fas Ligand, a Novel Member of the Tumor Necrosis Factor Family. *Cell*, v. 75, p. 1169–1178, 1993.
- SUPEK, F. *et al.* REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. v. 6, n. 7, 2011.
- TOLEZANO, J. E. *et al.* The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 149, n. 3–4, p. 280–284, 2007.
- TSCHOEKE, D. A. *et al.* Evolutionary Bioinformatics. *Evolutionary Bioinformatics*, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2014.
- TSIGANKOV, P. *et al.* Phosphoproteomic analysis of differentiating *Leishmania* parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif. *Journal of Proteome Research*, v. 12, n. 7, p. 3405–3412, 2013.
- TUON, F. F. *et al.* Toll-Like Receptors and Leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 76, p. 866–872, 2008.
- UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology*, v. 28, n. 8, p. 335–344, 2012.

- ÜNLU, M.; MORGAN, M. E.; MINDEN, J. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, v. 18, p. 2071–2077, 1997.
- URIBE-QUEROL, E.; ROSALES, C. Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1–23, 2017.
- UZCANGA, G. *et al.* Nuclear DNA replication and repair in parasites of the genus *Leishmania*: Exploiting differences to develop innovative therapeutic approaches. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 156–177, 2017.
- VALDIVIA, H. O. *et al.* Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. *Scientific Reports*, v. 7, n. December 2016, p. 1–11, 2017.
- VALDIVIA, H. O. *et al.* The *Leishmania* metaphylome : a comprehensive survey of *Leishmania* protein phylogenetic relationships. p. 1–13, 2015.
- VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 2004. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.173.11.6521>>.
- VAUX, D. L.; HAECKER, G.; STRASSER, A. An Evolutionary on Apoptosis Perspective Minireview. *Cell*, v. 76, p. 777–779, 1994.
- VEER, M. J. DE *et al.* MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major* : possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. p. 2822–2831, 2003.
- VERAS, P. S. T.; DE MENEZES, J. P. B. Using proteomics to understand how *Leishmania* parasites survive inside the host and establish infection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 8, 2016.
- WANG, Y. *et al.* Mycobacteria Inhibition of IFN- γ Induced HLA-DR Gene Expression by Up-Regulating Histone Deacetylation at the Promoter Region in Human THP-1 Monocytic Cells. *The Journal of Immunology*, v. 174, p. 5687–5694, 2005.
- WESTMAN, J. O.; TAHERZADEH, M. J.; FRANZÉN, C. J. Proteomic Analysis of the Increased Stress Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* Encapsulated in Liquid Core Alginate-Chitosan Capsules. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, p. 1–12, 2012.
- WHO. WHO: Weekly epidemiological record: Global leishmaniasis update, 2006–2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. *World Health Organization*, v. 92, p. 557–572, 2017.
- WILKINS, M. R. *et al.* Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 13, n. 1, p. 19–50, 1996.
- WISTRAND, M.; SONNHAMMER, E. L. L. Improved profile HMM performance by assessment of critical algorithmic features in SAM and HMMER. v. 10, p. 1–10, 2005.
- YANG, Y. *et al.* Heat Shock Protein gp96 Is a Master Chaperone for Toll-like Receptors and Is Important in the Innate Function of Macrophages. *Immunity*, v. 26, n. 2, p. 215–226, 2007.
- YANG, Z.; MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* Infection of Macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 2, p. 1077–1085, 2007.
- YAO, C. *et al.* Biosynthesis of the major surface protease GP63 of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 121, n. 1, p. 119–128, 2002.
- YAO, C. Major surface protease of trypanosomatids: One size fits all? *Infection and Immunity*, v. 78, n. 1, p. 22–31, 2010.
- YAO, C. *et al.* Multiple products of the *Leishmania chagasi* major surface protease (MSP or GP63) gene family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 135, n. 2, p. 171–182, 2004.

YAO, C. *et al.* Proteomic examination of *Leishmania chagasi* plasma membrane proteins: contrast between avirulent and virulent (metacyclic) parasite forms. *Proteomics Clin Appl.*, v. 4, n. 1, p. 4–16, 2010.

YE, X. *et al.* Linker Histone in Diseases. v. 13, 2017.

ZHANG, X. *et al.* Epigenome-wide differential DNA methylation between HIV-infected and uninfected individuals. *Epigenetics*, v. 11, p. 750–760, 2016.

ZHANG, Y. *et al.* Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. v. 113, n. 4, p. 2343–2394, 2013.

ZHAO, M.; MISHRA, L.; DENG, C. X. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *International Journal of Biological Sciences*, v. 14, n. 2, p. 111–123, 2018.