

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Identificação de proteínas antigênicas e diferencialmente
abundantes em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L.*
(Viannia) braziliensis
e *L. (L.) infantum*

Bruna Soares de Souza Lima Rodrigues

Belo Horizonte
2017

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Identificação de proteínas antigênicas e diferencialmente abundantes em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) infantum*

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

Área de concentração: Protozoologia.

Orientadora: Prof. Dra. Héli da Monteiro de Andrade

Co-orientadora: Dra. Simone da Fonseca Pires

Belo Horizonte
2017

Dedico este trabalho ao meu filho, Rafael e ao meu marido, Léo!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu chegar até aqui!

Ao meu filho Rafael, minha razão de viver!!! Foi ele que me fortaleceu nos momentos mais difíceis. Seu abraço carinhoso me enchia de disposição para continuar, durante muitas madrugadas.

Ao Léo, meu marido, amigo, amor, companheiro e o meu maior incentivador, uma pessoa muito especial e paciente, que fez e faz da minha vida uma existência perfeita. Sem você, nada teria o menor sentido.

Aos meus pais, Bruno e Rejane, que sempre me apoiaram na realização de todos os meus sonhos, e são os meus verdadeiros heróis. Obrigada pelos ensinamentos, que me deram coragem para enfrentar todos os obstáculos, não foram poucos... Vocês são pessoas muito especiais, pais incríveis, enfim, são tudo para mim.

Às minhas irmãs Marcela, Daniela e Paulinha, que sempre estiveram do meu lado, nos momentos tristes e alegres. Minhas amigas de sangue e coração. Sempre pacientes para ouvir meus choros, meus lamentos, mas principalmente, meus “gritos” de alegria.

À querida professora Héliida pelos ensinamentos e momentos de alegria, nesses seis anos de convivência. A orientação foi impecável, mas o melhor de tudo foi poder conhecer a pessoa maravilhosa que ela é. Amiga, companheira, humana, enfim, uma pessoa incrível, que sempre cuidou de mim, e de todos que convivem com ela. Obrigada por tudo!!! A orientação dessa tese acaba agora, mas nossa amizade continua.

À turma do “Pepino” com quem passei momentos tristes, felizes e muito emocionantes. Essa caminhada foi de muito aprendizado ao lado de todos vocês!

Ao meu grande e querido amigo Kléber Fortes. Foi, sem dúvida, a pessoa em que mais pensei nessa reta final. Queria muito você aqui!!! Ao lado de Deus, tenho certeza que você está torcendo por mim! A saudade é enorme.

As minhas grandes amigas Ana Luíza, Luciana Lima, Bruna Torres, Thais, Rafaela Paim e Leticia Marques, que estiveram comigo desde antes do ingresso no mestrado.

À Júlia que se tornou extremamente importante na minha vida. Nossa amizade ultrapassou todos os limites. Nos conhecemos no mestrado, e hoje, as famílias são amigas. Foram muitos momentos de felicidade, de conversas intermináveis, desabafo, desespero, mas principalmente de muitas alegrias. Adoro você!!!

À minha mais nova e grande amiga Gabriela Santana! Sem você, seria tudo mais complicado.

A todos do laboratório de Leishmanioses: Júnior, Simone, Gabi, Ramon, Elaine, Jordanna, Angélica, Ivana, Adriana, João Carlos, pela convivência intensa e feliz. Vocês contribuíram muito para o meu crescimento.

Ao Dr. Tiago Mendes pela colaboração e amizade.

Ao Dr. José Edward Oliverira e ao Dr. Carlos Chávez pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

As agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliarem o meu trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia e ao Departamento de Parasitologia – ICB-UFMG.

Aos professores do Programa de Pós graduação em Parasitologia pelos ensinamentos e disponibilidade.

Às secretárias Sumara e Sibebe, que sempre estiveram disponíveis para nos ajudar em tudo.

Aos colegas do Departamento.

RESUMO

As leishmanioses são doenças com ampla diversidade de formas clínicas, devido a diferentes espécies. A leishmaniose tegumentar (LT) está frequentemente associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e/ou *L. (Viannia) braziliensis*, enquanto a forma visceral (LV) é causada por *L. (L.) infantum*. As proteínas por sua vez, estão entre as principais moléculas que podem determinar as mais diversas variações biológicas. Outro aspecto relevante é que um diagnóstico eficiente contribui para a avaliação não só clínica, mas também da epidemiologia e controle da doença. No presente trabalho, por meio de abordagem proteômica de expressão diferencial em gel (DIGE), identificamos proteínas diferencialmente abundantes entre as espécies de *Leishmania* mais frequentes no Brasil, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) infantum*. Através da utilização de ferramentas de bioinformática, foram mostradas as interações dessas proteínas em redes biológicas, bem como os processos biológicos nos quais essas moléculas atuam. No nosso trabalho destacamos 6 dessas categorias funcionais: metabolismo do nitrogênio, resposta ao stress, organização do citoesqueleto, transporte, desenvolvimento de estruturas e vias associadas à regulação do sistema imune; sendo que, nessa última, o enriquecimento estava presente somente em *L. braziliensis* e *L. infantum*. Os dados revelaram que *L. infantum*, espécie com maior potencial de visceralização, apresentou maior quantidade de proteínas detectadas para quase todos os processos. Selecionamos dentre essas proteínas quais eram também antigênicas de acordo com a forma clínica, LT ou LV, dos soros utilizados no western blot. As proteínas antigênicas foram submetidas a uma análise *in silico* para a predição de epitopos para células B que não possuíam similaridades com ortólogos em *Trypanosoma cruzi*. Das 18 proteínas identificadas com essas características (mais abundantes, específicas e antigênicas em uma espécie em relação às outras) oito são das espécies causadoras da forma tegumentar da doença (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*) e 10 na espécie que causa a forma visceral (*L. infantum*). Os 68 epitopos preditos simultaneamente pelos softwares ABCPred e BCPreds nessas proteínas, foram sintetizados em membrana de celulose e avaliados em relação a reatividade. Considerando os dados analisados, podemos destacar duas proteínas de *L. amazonensis*, que apresentam potencial para diagnóstico específico de LT: metalo-peptidase, Clan MA (E)-Familia M3 e uma proteína hipotética. Ambas são mais abundantes nessa espécie, apresentam reatividade exclusiva ao *pool* de soros de LT e a maioria dos epitopos não apresenta similaridade com os ortólogos em *T. cruzi*. Além disso, nove epitopos, provenientes das proteínas selecionadas por reatividade exclusiva de soros de pacientes com LT ao extrato de *L. amazonensis*, foram considerados como potenciais antígenos para o diagnóstico sorológico da LT em humanos.

Palavras chave: imunoproteoma, *Leishmania*, diagnóstico, redes biológicas.

ABSTRACT

Leishmaniasis are disease with a wide diversity of clinical forms, due to the different species. The cutaneous leishmaniasis (LT) is frequently associated with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and / or *L. (Viannia) braziliensis* infection, while the visceral form (LV) is caused by *L. (L.) infantum*. Proteins are one of the main molecules that determinete the largest number of biological variations. Another relevant aspect is that an efficient diagnosis contributes not only to clinical evaluation, but also to disease epidemiology and control. In the present study, by means of a proteomic approach (DIGE), we identified differentially abundant proteins among the most frequent *Leishmania* species in our country, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* and *L. (L.) infantum*. Through the use of bioinformatics tools, the interactions of these proteins in biological networks, as well as the biological processes in which these molecules act, were shown. In our study we highlight 6 of these functional categories: nitrogen metabolism, stress response, cytoskeletal organization, transport, development of structures and pathways associated with regulation of the immune system; being in the latter the enrichment was present in *L. braziliensis* and *L. infantum*, only. Data revealed that *L. infantum*, species with greater visceral potential, showed higher amount of proteins detected for almost all the processes. In addition, we selected from these proteins which were also antigenic according to the clinical form, TL or VL, of the sera used in the western blot. Antigenic proteins were subjected to in silico analysis for the prediction of B cell epitopes without similarities with orthologs in *Trypanosoma cruzi*. Among 18 proteins identified with these characteristics (more abundant, specific and antigenic in one species relative the others) eight belongs to species that cause the cutaneous form of the disease (*L. amazonensis* and *L. braziliensis*) and 10 belongs to the species that cause the visceral form (*L. infantum*). The 68 epitopes predicted simultaneously by the ABCPred and BCPreds software in these proteins were synthesized in cellulose membrane and evaluated for reactivity. Considering the analyzed data, we highlight two proteins of *L. amazonensis*, which have potential for specific diagnosis of TL: metallopeptidase, Clan MA (E) -Familia M3 and a hypothetical protein. Both are more abundant in this species, they have exclusive reactivity to the sera from TL pool and most of the epitopes no show similarity to orthologs in *T. cruzi*. In addition, nine epitopes from proteins selected by exclusive reactivity of sera from TL patients to *L. amazonensis* extract were considered as potential antigens for the serological diagnosis of TL in humans.

Key words: immunoproteomic, *Leishmania*, diagnosis, biological networks.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento experimental.

Figura 2: Esquema de análise do *software DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software* v7.2 (GE - Healthcare).

Figura 3: Imagem representativa dos Géis 2-DE de *L. amazonensis*.

Figura 4: Imagem representativa dos Géis 2-DE de *L. braziliensis*.

Figura 5: Imagem representativa dos Géis 2-DE de *L. infantum*.

Figura 6: Índice de correlação.

Figura 7: Imagem representativa da eletroforese diferencial (DIGE).

Figura 8: Visão 3D de *spots* selecionados com diferença de intensidade nas espécies de *Leishmania*.

Figura 9: Representação gráfica da porcentagem de *spots* mais intensos em *L. amazonensis* (A), *L. braziliensis* (B) e *L. infantum* (C).

Figura 10: *Spots* mais intensos em *L. amazonensis*.

Figura 11: *Spots* mais intensos em *L. braziliensis*.

Figura 12: *Spots* mais intensos em *L. infantum*.

Figura 13 A: *Heatmap* das proteínas com níveis de abundância diferentes entre *L. braziliensis* (Lb) e *L. infantum* (Li).

Figura 13 B: *Heatmap* das proteínas com níveis de abundância diferentes entre *L. amazonensis* (La) e *L. braziliensis* (Lb).

Figura 13 C: *Heatmap* das proteínas com níveis de abundância diferentes entre *L. amazonensis* (La) e *L. infantum* (Li).

Figura 14: Análise de componente principal (PCA).

Figura 15 A: Rede de interação proteína- proteína de *L. amazonensis*.

Figura 15 B: Rede de interação proteína- proteína de *L. braziliensis*.

Figura 15 C: Rede de interação proteína- proteína de *L. infantum*.

Figura 16: Análise dos processos biológicos enriquecidos.

Figura 17: Western blot de *L. amazonensis*.

Figura 18: Western blot de *L. braziliensis*.

Figura 19: Western blot de *L. infantum*.

Figura 20: Seleção de *spots* antigênicos e com abundância aumentada em *L. amazonensis*.

Figura 21: Seleção de *spots* antigênicos e com abundância aumentada em *L. braziliensis*.

Figura 22: Seleção de *spots* antigênicos e com abundância aumentada em *L. infantum*.

Figura 23: Diagrama de Venn.

Figura 24: Imagem representativa do ensaio em membrana de nitrocelulose.

Figura 25: Peptídeos reativos ao *pool* de soros de humanos diagnosticados com LT ou LV.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema de marcação com CyDye dos extratos proteicos de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Tabela 2: Esquema de utilização das membranas e dos *pools* de soros de pacientes diagnosticados com Leishmaniose Visceral (LV), Leishmaniose Tegumentar (LT) e soros de indivíduos saudáveis (C).

Tabela 3: Categorização funcional das proteínas identificadas segundo análise no Gene Ontology (GO).

Tabela 4: Proteínas antigênicas e diferencialmente abundantes em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*

Tabela 5: Proteínas identificadas pela imunoproteômica, seus epitopos preditos e o percentual de homologia desses com seus ortólogos em *T. cruzi*.

Tabela 6: Proteínas identificadas pela imunoproteômica e os seus epitopos selecionados como potenciais para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar.

Tabela Suplementar: Proteínas diferencialmente abundantes em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DE	Eletroforese bidimensional
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> (Demanda bioquímica de oxigênio)
BVA	<i>Biological Variation Analysis</i>
DAT	Teste de aglutinação direta
DIA	<i>Differential In-gel Analysis</i>
DIGE	<i>Diferencial Gel Electrophoresis</i>
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDA	<i>Extended Data Analysis</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Espectrometria de massas
GO	Ontologia gênica
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSP 70	<i>Heat shock protein 70</i>
HSP 83	<i>Heat shock protein 83</i>
IAA	Iodoacetamida
IEF	<i>Isoelectric focusing</i>
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
INF γ	Interferon gama
IPTG	<i>Isopropylthio-β-galactoside</i>
KDa	kilodaltons
LIT	Liver infusion tryptose
LMC	Leishmaniose mucocutanea
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MM	Massa molecular
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>

NNN	Novy MacNeal-Nicolle
OD	<i>Optical Density</i> (Densidade óptica)
OPD	Ortho-phenylenediamine
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pI	Ponto isoelétrico
RPM	Rotações por minuto
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
WB	<i>Western blot</i>

Sumário

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 Leishmanioses e Leishmania	15
1.2 Formas clínicas da leishmaniose.....	17
1.2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana.....	17
1.2.2 Leishmaniose Visceral	18
1.3 Diagnóstico.....	19
1.4 Genômica e proteômica em Leishmania.....	24
1.5 Redes biológicas moleculares	28
2 INTRODUÇÃO	31
3 JUSTIFICATIVA	33
4 OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo Geral.....	34
4.2 Objetivos específicos	34
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
6 MATERIAIS E MÉTODOS	36
6.1 Parasitos/ extrato protéico	36
6.2 Eletroforese bi-dimensional- 2-DE	36
6.3 Análise dos géis DIGE.....	39
6.4 Identificação das proteínas (MALDI – TOF/TOF)	40
6.5 Análises de Bioinformática e identificação de processos biológicos associados com proteínas diferencialmente abundantes.....	41
6.6 Imunoproteômica	42
6.7 Predição de epitopos lineares de células B.....	43
6.8 Imunoensaio em técnica de spot síntese	44
7 RESULTADOS	46
7.1 Análise da reprodutibilidade dos Géis 2-DE.....	46
7.2 Differential Gel Electrophoresis (DIGE)	50
7.3 Identificação das Proteínas	57
7.4 Heatmap	58
7.5 Redes biológicas moleculares	61
7.6 Categorização das proteínas	65
7.7 Seleção das proteínas antigênicas	69
7.8 Sobreposição dos spots antigênicos e diferencialmente intensos.....	71
7.9 Predição de epitopos.....	79
7.10 Imunoensaio em técnica de spot síntese	81
8 DISCUSSÃO.....	85
9 CONCLUSÕES	90
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
11ANEXOS	105

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Leishmanioses e *Leishmania*

Atualmente, as leishmanioses encontram-se entre as principais endemias no mundo (WHO, 2015). Nas Américas tem caráter zoonótico podendo acometer o homem de forma acidental, quando este se insere no ciclo de transmissão do parasito. No Brasil, as leishmanioses apresentam importância nos contextos sanitário, econômico e social, devido a sua ampla distribuição geográfica e gravidade de suas manifestações clínicas. A doença tem se tornado ainda mais relevante, em virtude do aumento da incidência e disseminação de algumas formas clínicas para novas áreas geográficas, além da tendência a urbanização (Tolezano *et al.*, 1980; Lainson, 1989; Marzochi, 1992; Salomón *et al.*, 2015). As dificuldades referentes a epidemiologia da doença, considerando dados sobre o diagnóstico e o tratamento devem ser considerados, pois interferem diretamente no controle da doença (Marzochi & Marzochi, 1994).

Atualmente, existem cerca de 12 milhões de casos de leishmanioses em todo mundo, e estima-se que outros dois milhões de novos casos ocorram a cada ano, sendo cerca de 1,5 milhões de leishmaniose tegumentar (LT) e 500.000 de leishmaniose visceral (LV). As leishmanioses são prevalentes nos quatro continentes e endêmicas em 98 países. Mais de 90% dos casos de LV do mundo ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Sudão, Sudão do Sul e Etiópia, e mais de 90% dos casos de LT são relatados no Afeganistão, Argélia, Irã, Arábia Saudita e Síria no Velho Mundo, e no Brasil, Colômbia e Peru no Novo Mundo (Desjeux, 1996; Ashford, 2000; Murray *et al.*, 2005; WHO, 2015).

As leishmanioses são parasitoses causadas por protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (Ross, 1903). Considerados parasitos digenéticos, apresentam duas formas, as promastigotas, que são flageladas e encontradas no vetor; e as amastigotas, que são arredondadas e encontradas no hospedeiro vertebrado (Lainson & Shaw 1987; Grimaldi & Tesh, 1993; Ashford, 2000).

De acordo com Lainson e Shaw 1987, as espécies de *Leishmania* encontradas em mamíferos, no Novo Mundo, podem ser classificadas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Essa classificação se baseia principalmente no desenvolvimento do parasito no vetor. No subgênero *Viannia* o desenvolvimento ocorre no intestino posterior do

flebotomíneo, enquanto no subgênero *Leishmania*, no intestino médio e anterior do vetor. No primeiro subgênero encontram-se espécies causadoras das formas cutânea e mucocutânea da leishmaniose tegumentar nas Américas, das quais podemos citar: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni*. No subgênero *Leishmania* estão classificadas as espécies que causam as formas cutânea difusa, disseminada e localizada, representadas pela *L. (L.) mexicana* e *L.(L.) amazonensis* e as espécies causadoras da leishmaniose visceral, no Novo Mundo, representada pela *L. (L.) infantum* (Lainson & Shaw, 1987).

Cerca de 30 espécies diferentes de flebotomíneos podem atuar como vetores do protozoário e outras 20 espécies de *Leishmania* são conhecidas por causar algum tipo de manifestação clínica no homem (Desjeux, 1996). Sendo, os parasitos do gênero *Leishmania* digenéticos, o seu ciclo de vida é dividido entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. O ciclo de vida do parasito tem início quando uma fêmea do flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em um animal infectado, que funciona, então, como fonte de infecção para o inseto. Durante a ingestão de sangue, o invertebrado ingere células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), como, macrófagos infectados com as formas amastigotas. Essa forma intracelular do parasito é normalmente ovóide e o flagelo não é exteriorizado, ficando contido na bolsa flagelar, estrutura formada pela invaginação da membrana externa do parasito. No trato intestinal do flebotomíneo e envolvido por uma matriz peritrófica, que é secretada pelas células do epitélio intestinal, as amastigotas modificam-se em formas flageladas, alongadas, e móveis, denominadas promastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Esses vetores, ao realizarem novo repasto sanguíneo, regurgitam as formas infectivas nos hospedeiros vertebrados, e dessa forma ocorre a transmissão (Bates, 2007; Kaye & Scott P, 2011).

No hospedeiro vertebrado, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos e internalizadas em vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), estrutura envolvida na destruição do parasito. No entanto, o parasito apresenta mecanismos capazes de evadir da ação microbicida do macrófago, dentre outros, transformando-se em amastigotas. Inicia-se, então, o processo de multiplicação, que se estende, até a ruptura da célula, quando as amastigotas são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção. Durante este processo ocorre, ainda, a liberação de produtos antigênicos que serão apresentados ao sistema imune, gerando uma resposta imune específica. Os

mecanismos de eliminação das amastigotas pelos macrófagos ativados pelo IFN- γ , envolvem a síntese de radicais de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico (Matlashewski, 2001; Sacks & Noben-Trauth, 2002; Peters & Sacks, 2006). Alguns estudos mostraram o papel essencial dos neutrófilos na infecção por *Leishmania*, demonstrando a capacidade do parasito de evadir e explorar a resposta inata do hospedeiro para estabelecer e promover as doenças (Peters *et al.*, 2008).

1.2 Formas clínicas da leishmaniose

1.2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, presente em quase todos os países, com exceção do Chile e Uruguai (Gontijo & Carvalho, 2003; Lainson & Shaw, 2010). Trata-se de uma afecção dermatológica, considerada zoonose primária de mamíferos silvestres e que acomete o homem de forma acidental (Gontijo & Carvalho, 2003).

Embora cada uma das espécies de *Leishmania* cause manifestações clínicas e possua áreas de endemidade peculiares, nenhum desses aspectos é exclusivo de uma ou outra forma da doença, podendo essas manifestações se sobrepor. Isso ocorre porque o quadro clínico é dependente de determinantes relacionados à espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e ao hospedeiro. Dentre esses fatores, podemos citar: a infectividade, virulência e forma de disseminação do parasito, linfática ou hematogênica, além da resposta imune e susceptibilidade genética do hospedeiro (Grevelink & Lerner, 1996).

Dentre o espectro das formas clínicas de LT, podemos citar: a forma cutânea localizada, considerada a manifestação mais comum da leishmaniose tegumentar, causada, principalmente, por *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo e *L. braziliensis* e *L. mexicana* no Novo Mundo (Grevelink & Lerner, 1996). A resposta imune dessa forma da doença é predominantemente mediada por células T e um infiltrado inflamatório misto no local da infecção pode ser observado na maioria dos casos (Mehregan *et al.*, 1999). Outra variação da leishmaniose tegumentar, conhecida como forma difusa, é caracterizada como anérgica. No Velho Mundo pode ser causada pela *L. aethiopica*, no entanto, essa manifestação clínica é mais comumente encontrada, sendo causada pela *L.*

amazonensis no Novo Mundo. A forma disseminada da leishmaniose tegumentar é caracterizada por múltiplas lesões em duas ou mais áreas do corpo não contíguas, sendo uma forma rara, mas que tem aumentado a sua frequência no Novo Mundo. Nesse cenário, se encontra muitas vezes associada à co-infecção com HIV e uma resposta predominante do tipo Th2 pode ser observada (Turetz *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2004; Schraner *et al.*, 2005). Outras formas crônicas da LT, também raras, mas não menos importantes são: leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose dérmica pós calazar. A primeira possui manifestações clínicas, normalmente na superfície da mucosa do nariz, boca e faringe, e ocorre, comumente, de um a cinco anos após uma leishmaniose cutânea. Esta forma é proveniente da infecção, normalmente, por *L. (V) braziliensis*, no Novo Mundo; e afeta entre 1 a 10% dos casos não tratados de LT. A segunda forma clínica é normalmente observada após uma LV devido à infecção por *L. donovani* em países como Sudão e Índia (Ahluwalia *et al.*, 2004; Lawn *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2005).

1.2.2 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença de notificação compulsória e que pode ter evolução grave, devendo ser diagnosticada precocemente (Ministério da Saúde, 2006). A LV ocorre na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, sendo que, nesse último continente, 90% dos casos ocorrem no Brasil (Desjeux, 2004, Ministério da Saúde, 2006). A ausência de tratamento adequado da doença pode levar a morte, podendo a letalidade alcançar o índice de 90%, nos locais em que esse quadro se instaurar (Gontijo & Melo, 2004).

A LV é uma doença sistêmica causada pela *L. donovani* no Velho Mundo e *L. infantum* no Novo Mundo. Sinais e sintomas da doença incluem febre, esplenomegalia, emaciação, linfadenopatia, hiperglobulinemia e pancitopenia. Durante o período ativo da LV causada por *L. donovani* pode ocorrer o escurecimento desigual da pele explicando a origem do nome calazar, que significa febre negra. A pele normalmente se torna seca e áspera e a alopecia é frequente. O período de incubação da infecção é de normalmente dois a quatro meses, após o qual a doença passa para um curso crônico. É possível observar um aumento de IgG e IgM no soro do paciente, no entanto, uma baixa da

imunidade mediada por células predispõe o hospedeiro a infecções secundárias (Ghosh Dastidar *et al.*, 1983; Haldar *et al.*, 1983).

1.3 Diagnóstico

No Brasil as duas formas da doença, tegumentar e visceral, possuem ampla distribuição geográfica inclusive com áreas de sobreposição. As espécies mais frequentes e amplamente distribuídas são *L. (V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis*, causando a forma tegumentar e *L. (L.) infatum* causando a forma visceral (Ministério da Saúde 2006, 2007).

A faixa geográfica de ocorrência das leishmanioses tem aumentado devido a ampla variedade de fatores climáticos, ecológicos e sociais. Animais domésticos, bem como seres humanos, podem apresentar a forma assintomática da doença dificultando assim o seu diagnóstico (Reithinger & Dujardin, 2007; Gramiccia, 2011).

O tratamento efetivo e o controle das leishmanioses dependem de um diagnóstico acurado e precoce, de maneira a evitar o desenvolvimento de doença crônica e/ou de lesões desfigurantes (Van der Meide *et al.*, 2005). Diferentes métodos de diagnóstico associados são usados para a confirmação da infecção, dentre os quais podemos citar: o parasitológico, o molecular e o imunológico.

O teste de certeza no diagnóstico das leishmanioses é o parasitológico. Na LT esse método é realizado por aposição de fragmentos da lesão sobre uma lâmina, coloração com *Giemsa* e visualização das amastigotas em microscópio óptico. Dentre as vantagens, podemos destacar: o curto prazo para conclusão, o baixo custo e a execução fácil, e em relação às desvantagens podemos citar: a baixa sensibilidade e a necessidade de grande habilidade profissional (Weigle *et al.*, 1987; Marfurt *et al.*, 2003; Van der Meide *et al.*, 2005).

Para a realização desse método no diagnóstico da LV é necessário coletar amostras de aspirados de medula óssea, baço, linfonodo ou de fígado, tornando o método invasivo. A especificidade pode atingir aproximadamente 100%, mas, a sensibilidade é variável, sendo cerca de 95% em aspirados esplênicos, 70% em aspirados de medula e 60% em linfonodos (Zijlstra *et al.*, 1992). A coleta de material necessita de profissional experiente e bem treinado; e sendo o procedimento de difícil execução, deve

ser realizado em locais especializados. Em algumas situações, como de anemia grave, tendência à hemorragia ou em casos de gravidez, a técnica é contra-indicada (Desjeux, 2004). A punção de baço e fígado pode ser complicada e às vezes fatal (Siddig *et al.*, 1988; Zijlstra *et al.*, 1992), sendo a utilização do aspirado de medula óssea considerada a mais segura (Kafetzis & Maltezou, 2002).

As técnicas rotineiras de histologia e /ou imuno-histoquímica, que, também se baseiam na detecção das amastigotas em fragmentos de tecidos (biópsias), são também consideradas metodologias diretas de diagnóstico parasitológico. Um fator importante e que influencia na sensibilidade desse tipo de técnica é o sistema de detecção usado (Ramos-Vara *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2009), e o mais comumente empregado nas técnicas de imuno-histoquímica é o da estreptoavidina-biotina peroxidase (Tafari *et al.*, 2004; Ramos-Vara *et al.* 2008; Alves *et al.*, 2013; Marques *et al.*, 2017).

Outros métodos de diagnóstico parasitológico como o cultivo dos parasitos e a inoculação do material de biópsia em animais experimentais são realizados, principalmente, em centros de pesquisa. É realizado a partir de aspirado ou tecido e pode ser usado como forma de aumentar a sensibilidade do método parasitológico. O cultivo desses tecidos é geralmente realizado em meios de cultura como: meio líquido de LIT-*liver infusion tryptose* ou de *Schneider*, e meio de NNN – *Novy MacNeal-Nicolle*, ficando os índices de positividade da cultura de aspirado medular, entre 40-50%, enquanto que a de aspirado esplênico situa-se em torno de 70-98% (Singh & Sivakumar, 2003). Entretanto, é uma técnica que requer dias ou semanas para a conclusão do resultado, sendo essa uma desvantagem do método (Murray, 2000), e raramente usado para LT, exceto em trabalhos de pesquisa que pretendem identificar a espécie do parasito. Os animais experimentais mais utilizados são hamsters e camundongos. Os hamsters são susceptíveis a uma maior diversidade de espécies, enquanto os camundongos isogênicos, de acordo com a linhagem, variam de susceptíveis a resistentes conforme a espécie de *Leishmania*.

Os métodos moleculares também são usados no diagnóstico das leishmanioses, e dentre eles, podemos destacar a amplificação de alvos gênicos, conhecida como reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes (PCR multiplex, nested-PCR, RT-PCR, PCR quantitativo) (Britto *et al.*, 2005; Cupolillo, 2005). Essas são consideradas de alta sensibilidade, sendo capazes de amplificar o alvo, mesmo que ele esteja em quantidade

mínima nas amostras clínicas analisadas. Além disso, as amostras podem ser coletadas de maneira menos invasiva, e há geração de um resultado seguro num pequeno intervalo de tempo (Ikonomopoulos *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004). Apesar de todas as vantagens, essas técnicas não são empregadas na rotina. Baneth & Aroch 2008, mostraram resultados variáveis e conflitantes com relação à sensibilidade da PCR ao avaliar diferentes tecidos de cães infectados. Isso poderia ser explicado em parte pela distribuição heterogênea dos parasitos em cada tecido, considerando o tropismo da cepa de *Leishmania* envolvida na infecção, bem como, a resposta imune local (Maia & Campino, 2008). Além disso, a eficácia de um teste de PCR é influenciada por diferentes fatores, tais como os primers utilizados, o número de parasitos existentes na amostra, o método de extração do DNA e o protocolo de PCR seguido (Alvar *et al.*, 2004; Baneth & Aroch, 2008; Gaulda *et al.*, 2015; Muller *et al.*, 2015; Mans *et al.*, 2016; Mohammadi *et al.*, 2017).

Em relação aos métodos de diagnóstico imunológicos, eles podem ser agrupados em: celulares e sorológicos, sendo o primeiro deles mais adequado para LT e o segundo para LV. Para o diagnóstico imunológico da LT, o teste intradérmico ou intradermorreação de Montenegro, baseado na hipersensibilidade celular tardia, é muito usado e apresenta especificidade e sensibilidade satisfatórias (Weigle *et al.*, 1991; Reithinger & Dujardin, 2007). Entretanto, em áreas endêmicas, a reação positiva pode ser devido à doença, inoculação do antígeno anteriormente, exposição ao parasito sem doença, alergia ao diluente, ou ainda reação cruzada com outras doenças (Carvalho *et al.*, 1995). A mesma pode ser negativa entre quatro a seis semanas após o surgimento da lesão na pele, exacerbada no caso da forma mucocutânea ou ainda negativa na forma difusa e em pacientes imunossuprimidos (Melo *et al.*, 1977; Souza *et al.*, 1992). Outra desvantagem do método é requerer cultura do parasito para produção do antígeno, além disso, o modo e condições de preparo por diferentes laboratórios, pode influenciar na sensibilidade da técnica. Esse método não é usado para diagnóstico de LV.

Os métodos sorológicos são utilizados, principalmente, no diagnóstico da LV, devido aos altos níveis de anticorpos nos pacientes com essa forma da doença (Galvão-Castro *et al.*, 1984; Burns *et al.*, 1993). A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é realizada por meio de uma diluição seriada do soro do hospedeiro suspeito, que são posteriormente incubados em uma lâmina sensibilizada com as formas promastigotas do parasito. A ligação entre o antígeno e o anticorpo, no caso dos positivos ou falsos

positivos, é revelada após ser adicionado um anti-anticorpo conjugado com molécula fluorescente. Trata-se de um teste com boa sensibilidade e especificidade, mas que necessita de profissional treinado para a sua execução (Gradoni & Gramiccia, 2008). A sensibilidade varia de 82 a 95%, enquanto a especificidade varia de 78 a 92%, dependendo da espécie de *Leishmania* e do modo de preparo do antígeno (Sengupta, 1969; Cahil, 1970; Assis *et al.*, 2008). Outros testes sorológicos usados para diagnóstico da LV são o teste de aglutinação direta (DAT) e o teste imunocromatográfico. O DAT se baseia na reação do soro do paciente com as promastigotas íntegras de *Leishmania*. Alguns estudos têm mostrado sensibilidade e especificidade variando entre 91 a 100% e 72 a 100%, respectivamente (Mengistu *et al.*, 1990; Zijlstra *et al.*, 1991; Sundar *et al.*, 1996). Apesar da boa sensibilidade e a dispensa de equipamentos sofisticados para sua execução, é necessário longo período para execução e apresenta baixa especificidade em áreas endêmicas (Harith *et al.*, 1988; Saul & Semião 1996; Mohebbali, 2004; Kumar *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011). O teste imunocromatográfico consiste em um teste sorológico considerado simples e a interpretação das reações é visual. Reithinger *et al.*, 2002, verificaram especificidade entre 61 a 75% e sensibilidade entre 72 a 77%, no teste imunocromatográfico que utiliza rK39 de *Leishmania* como antígeno. Outros trabalhos também demonstraram a utilização do teste imunocromatográfico, bem como os valores de sensibilidade e especificidade encontrados (Sundar *et al.*, 1998; Bern *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2003; Ritmeijer *et al.*, 2006).

O *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) é um método sensível e de especificidade dependente do antígeno utilizado (Mancianti *et al.*, 1995; Gradoni & Gramiccia, 2008). Outra vantagem da técnica é permitir a automação na execução e avaliação de um grande número de amostras. Os valores de sensibilidade e especificidade variam de 90-100% e 71-100%, respectivamente (Bray 1985, Choudhry 1990; Pedras *et al.*, 2008). Embora vários antígenos venham sendo testados (Soto *et al.*, 1996; Sundar & Rai, 2002; Singh & Sivakumar, 2003; Faria *et al.* 2011; Fonseca *et al.* 2014), o antígeno total, derivado do lisado de promastigotas de *Leishmania* spp, é o mais usado, e a ocorrência de resultados falso-positivos podem ser recorrentes (Roffi *et al.*, 1980; Guimarães *et al.*, 1991; Kalter, 1994; Romero *et al.*, 2005; Cataldo *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2013). Além disso, os testes ainda não são capazes de distinguir infecções passadas

de reinfecções, pela persistência de anticorpos anti-*leishmania* mesmo após o tratamento e cura da doença (Hailu *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011).

Nesse sentido, várias proteínas recombinantes estão sendo testadas para o diagnóstico da LV utilizando o ELISA, considerando os altos níveis de anticorpos nessa forma clínica. O antígeno recombinante K39, pertencente à superfamília das cinesinas, apresenta um menor número de reações cruzadas, quando comparado ao antígeno bruto (Carvalho *et al.*, 2003).

Santarém *et al.*, 2005, testaram a prevalência de anticorpos específicos contra várias moléculas para avaliar a imunogenicidade dessas proteínas e seu potencial para o diagnóstico da LV humana. O resultado destaca, dentre as proteínas testadas, a recombinante *LicTXNPx*, que demonstrou uma sensibilidade de 78%, especificidade de 94%, e ainda uma capacidade de 60% em distinguir infecção e cura.

Fonseca *et al.*, 2014 revelaram quatro proteínas recombinantes anotadas como “hipotéticas” no genoma de *Leishmania*, como bons antígenos para o diagnóstico da LVC, com potencial para utilização em testes de triagem. Os resultados de sensibilidade variaram entre 70,6 e 85,4% e especificidade de 60 a 90%. Uma dessas proteínas apresentou, ainda, bons resultados para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana, necessitando de mais estudos.

Faria *et al.*, 2011 demonstraram o potencial de peptídeos sintéticos como antígenos no ELISA para diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Os resultados mostraram uma sensibilidade entre 71,03 a 84,10% e especificidade entre 55 e 80%, dependendo do peptídeo empregado.

Além de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos, a utilização de proteínas multiepitopos, ou também chamadas de proteínas quimeras, tem sido uma forma de inovação na escolha de antígenos. Por exemplo, Faria *et al.*, 2015 demonstraram a utilização de proteínas multiepitopos (PQ-10 e PQ20), em ensaios imunoenzimáticos, e o grande potencial dessas quimeras no diagnóstico precoce da LVC.

Para a LT, apesar dos baixos níveis de anticorpos, estudos utilizando proteínas recombinantes têm demonstrado resultados satisfatórios para utilização dos métodos sorológicos no diagnóstico da LT (Souza *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2015).

Souza *et al.*, 2013 usaram um painel de soros humanos para testar várias proteínas recombinantes, usando ELISA, com o objetivo de desenvolver uma ferramenta

para o diagnóstico sorológico da LT humana. Dentre as proteínas testadas, a rHSP 70 apresentou uma sensibilidade entre 52-80% e especificidade entre 81,7-92,2%. Essa variação foi devido à utilização de pacientes com a forma cutânea e mucocutânea.

Celeste *et al.*, 2014, avaliaram o uso da rHSP-83 para o diagnóstico das leishmanioses cutânea, mucocutânea e visceral; e ainda o seu potencial para monitorar a terapia da doença. A sensibilidade da rHSP-83 foi maior quando comparada aos valores utilizando antígeno bruto de *L. major-like*, bem como a especificidade, em cerca de 97,47% para rHSP-83 e 70,89% para antígeno bruto de *L. major-like*. Entretanto, a recombinante não se mostrou eficiente para avaliar cura de infecção.

Segundo o Ministério da Saúde, o procedimento de primeira escolha para diagnóstico da LT em humanos, na ocorrência de lesões típicas, é a demonstração do parasito em exames diretos. No entanto, a sensibilidade do método é inversamente proporcional ao tempo de evolução das lesões e depende de pessoal técnico altamente habilitado. O diagnóstico clínico epidemiológico pode ser complementado pela intradermorreação de Montenegro (IDRM), um teste que se fundamenta na visualização da resposta de hipersensibilidade celular tardia, mas sua eficácia é dependente de antígeno padronizado e não permite automação. Para a LV, o exame imunológico mais utilizado no Brasil é a RIFI e os ensaios imunoenzimáticos. Na presença de dados clínicos e laboratoriais, um teste sorológico reagente, reforça o diagnóstico de leishmaniose visceral. Entretanto, esses testes utilizam antígenos totais e as reações cruzadas são frequentes. (Ministério da Saúde 2006, 2007).

Considerando o exposto, um diagnóstico mais preciso e eficaz ainda é necessário para o diagnóstico das leishmanioses, e ferramentas mais modernas podem auxiliar neste processo.

1.4 Genômica e proteômica em *Leishmania*

Os genes, em tripanossomatídeos, apresentam uma organização policistrônica, desta forma, todos os genes que pertencem àquela unidade apresentarão a mesma taxa de transcrição. A maturação dos mRNAs transcritos ocorre através do *trans-splicing* e da poliadenilação, enquanto que a regulação da expressão gênica ocorre, preferencialmente, a nível pós transcricional (LeBowitz *et al.*, 1993; Vanhamme & Pays, 1995; Ullu *et al.*, 1993; Vasconcelos *et al.*, 2012).

A estabilização ou desestabilização do transcrito é um dos mecanismos já descritos para a regulação da expressão gênica; e que pode afetar o tempo de meia vida de uma molécula de mRNA, influenciando diretamente a quantidade de proteína produzida a partir da molécula molde (De Gaudenzi *et al.*, 2011; Araújo & Teixeira 2011).

Os tripanossomatídeos, assim como outros parasitos obrigatórios (Wolf & Koonin, 2013), apresentam redução do número de genes quando comparados aos organismos de vida livre. Isso ocorre, pois, muitas moléculas que participam de importantes processos biológicos, bem como do ciclo biológico desses protozoários, são obtidas de seus hospedeiros. A elucidação dessa área do conhecimento pode contribuir para o melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro, permitindo o reconhecimento de determinantes de virulência e patogenicidade, além de alvos para vacinas e drogas (Sakharkar *et al.*, 2004; Jackson 2015).

Análises comparativas entre os genomas de tripanossomatídeos revelaram alto grau de sintenia, que pode atingir 99% entre espécies de *Leishmania* (El-Sayed *et al.*, 2005; Peacock *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2012).

Peacock *et al.*, 2007 revelaram uma notável conservação do conteúdo gênico e da organização gênica entre *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. Mostraram, ainda, a elevada conservação das sequências de codificação, com a identidade média de aminoácidos entre *L. major* e *L. infantum* de 92% e identidade média de nucleotídeos de 94%. Entre *L. major* e *L. braziliensis* esses valores são de 77% e 82%, respectivamente; e entre *L. infantum* e *L. braziliensis*, 77% e 81%, respectivamente.

Cerca de 200, dos 8300 genes apresentaram distribuição diferenciada entre os genomas de *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. A espécie que apresentou maior divergência foi *L. braziliensis*, com 47 genes ausentes nas outras duas espécies. Em *L. infantum* o número de genes específicos foi 27, enquanto em *L. major*, apenas cinco (Peacock *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007).

Em geral, as proteínas de superfície de tripanossomatídeos apresentam alto grau de polimorfismo e glicosilação (Ferguson, 1997) e conjuntamente com a diferença de níveis de proteína, este polimorfismo de glicoconjugados de superfície pode estar relacionado com interações diferenciais com os hospedeiros, resultando nas diferenças observadas entre as espécies (de Assis *et al.*, 2012). A origem e expansão do repertório de proteínas podem ser geradas através da duplicação gênica, originando novos genes e

maior variabilidade, uma vez que uma das cópias mantém a sequência e codifica a proteína funcional, e as demais podem sofrer variabilidade sem prejuízo para o organismo (Chamond *et al.*, 2005; Lynch & Conery, 2000).

Assim, estudos proteômicos poderão auxiliar o entendimento dos fatores envolvidos na determinação do fenótipo clínico das diferentes espécies de *Leishmania*, visto que, esses métodos permitem avaliar a presença e a quantidade das proteínas em uma amostra biológica.

Por meio da análise proteômica quantitativa de *Leishmania* têm sido demonstrada fraca correlação dos níveis protéicos com a abundância de transcritos, corroborando que a regulação da produção de proteína em *Leishmania* ocorre a nível pós transcricional e/ou traducional (Holzer *et al.*, 2006; Cohen-Freue *et al.*, 2007).

Além disso, uma das grandes inovações associadas as análises de proteômica, além de auxiliar o entendimento da biologia de um organismo baseado na identificação e quantificação de proteínas presentes em uma determinada condição, é a possibilidade de identificar novos alvos terapêuticos, novas moléculas bioativas e marcadores biológicos que possam ser usados para diagnóstico, prognóstico de doenças ou ainda como candidatos a imunógenos de vacinas (Costa *et al.*, 2011, Lima *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017).

A proteômica representa um conjunto de técnicas que permite aumentar nosso conhecimento sobre a célula baseando-se na identificação e quantificação de proteínas em diferentes condições sendo a eletroforese bi-dimensional (2-DE), uma das ferramentas para estudar a expressão de proteínas em larga escala (Thiel & Bruchhaus, 2001). A análise das proteínas utilizando 2-DE envolve a separação sistemática, identificação e quantificação de muitas proteínas simultaneamente a partir de uma única amostra. Essa técnica também é capaz de separar as proteínas quanto a modificações pós-traducionais, as quais não podem ser observadas por sequenciamento do genoma e análise transcriptômica (Zhao & Jensen, 2009; Pagel *et al.*, 2015). A 2-DE é uma ferramenta poderosa e amplamente utilizada para análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas e é complementada pela espectrometria de massa (EM) para identificação das proteínas.

Estudos do proteoma de *Leishmania* foram realizados principalmente para comparação dos diferentes estágios do ciclo de vida de *L. donovani* (Bente *et al.*, 2003),

L. infantum (El Fakhry *et al.*, 2002; Brotherton *et al.*, 2010) e *L. infatum* e *L. mexicana* (Lynn *et al.*, 2013). Foram descritas, ainda, diferenças na abundância de proteínas entre cepas de *L. infatum* (da Fonseca Pires *et al.*, 2014 e Carnielle *et al.*, 2014) e entre espécies: *L. (V) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* (Gongora *et al.*, 2003); *L. amazonensis* e *L. major* (Brobey *et al.*, 2006). Esses trabalhos contribuíram para o entendimento de diversos mecanismos biológicos do parasito; dentre eles, os envolvidos nos processos de infecção, sobrevivência e patogenicidade, além daqueles relacionados a resistência a determinadas drogas. Por exemplo, da Fonseca Pires *et al.*, 2014 demonstraram que a cepa BH 400 de *L. infatum* é mais infectiva e patogênica quando comparada à cepa BH 46 de *L. infatum*. E uma análise comparativa entre os proteomas dessas cepas revelaram algumas moléculas que poderiam estar envolvidas nessa diferença de infectividade e patogenicidade, dentre elas a KMP-11, proteína mais abundante em BH 400. Carnielli *et al.*, 2014 usaram amostras de *L. infatum* isoladas de pacientes com LV, com diferentes resultados para o tratamento com miltefosina. O proteoma desses isolados revelou proteínas com níveis diferentes de abundância, demonstrando o provável envolvimento dessas moléculas na resistência à droga testada.

Um estudo utilizando 2-DE de extrato de promastigotas de *L. infantum*, seguido de Western Blot com soro de coelhos imunizados e análise por EM, permitiu a identificação de várias proteínas antigênicas relevantes (Dea-Ayuela *et al.*, 2006). Numa abordagem semelhante, foram identificados vários antígenos de *L. donovani* utilizando soros e parasitos isolados de pacientes indianos permitindo concluir que a abordagem imunoproteômica produz uma compreensiva e altamente resolvida representação da antigenicidade de *L. donovani* e da especificidade da resposta imune anti-*leishmania* em pacientes com LV (Forgber *et al.*, 2006). Da mesma forma, foram identificados antígenos em extrato de proteínas de promastigotas e amastigota-like de *L. infatum* reconhecidos por anticorpos presentes em soro de cães com LV, assintomáticos e sintomáticos (Coelho *et al.*, 2012).

Em síntese, os estudos proteômicos com *Leishmania* já demonstraram a diferença de abundância proteica entre amastigotas de cultivo *in vitro* e promastigotas e a possibilidade de utilização da “Imunoproteômica” como uma abordagem adequada para mapeamento da antigenicidade na leishmaniose. Neste sentido, nosso grupo publicou alguns artigos importantes. Costa *et al.*, 2011 realizaram um estudo proteômico de *L.*

infantum comparando a abundância diferencial de proteínas entre formas amastigotas e promastigotas por meio da tecnologia de DIGE (differential gel electrophoresis) e ainda a identificação de proteínas imunogênicas nessa espécie associando a 2-DE (eletroforese bi-dimensional) e western blot com soros caninos. Essa abordagem nos permitiu identificar novos alvos para diagnóstico e vacina na LV canina. Lima *et al.*, 2016 identificaram, através de estudo imunoproteômico, proteínas secretadas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* que podem ser usadas como alvos para detecção antigênica em infecções por *Leishmania*. Entretanto, trabalhos acerca das diferenças entre os níveis de proteínas e antigenicidade específica entre as três espécies de *Leishmania* mais frequentes no Brasil: *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* são ainda inéditos apesar da potencial aplicação.

1.5 Redes biológicas moleculares

Estudos em larga escala como os que usam abordagem genômica e/ou proteômica, geram um grande número de dados que precisam ser interpretados do ponto de vista biológico. Dessa forma, a modelagem de sistemas biológicos é uma ferramenta que permite extrair informações biologicamente relevantes de dados produzidos por métodos de larga escala, além disso, permite a integração de dados de diferentes experimentos para produção de modelos mais acurados (Chuang *et al.*, 2010; Faria *et al.*, 2014; Schmid & Blank, 2010). Entre as abordagens de modelagem de sistemas biológicos estão a predição de redes de interação proteína-proteína (De Las Rivas *et al.*, 2010), reconstrução de modelos metabólicos baseados em dados de genômica (Bart & Martens *et al.*, 2012) e redes de correção gênica geralmente associada a dados de transcriptômica (Belcastro *et al.*, 2011). Atualmente, esses modelos existem para uma grande diversidade de organismos, incluindo espécies procariotas, archaea e eucariotas (Reed *et al.*, 2006; Faria *et al.*, 2014). Entretanto, devido as limitações de informação geradas nas técnicas de larga escala e dificuldade matemática de modelagem, os modelos são considerados aproximações otimizadas e desvios podem ocorrer em relação à consequência da expressão gênica na atividade metabólica. Para uma real associação, é necessária a integração de outros fatores, dos quais podemos citar a atividade da RNA

polimerase, fatores de transcrição, promotores, entre outros (Struhl, 1999; Faria *et al.*, 2014).

As redes biológicas revelam as associações entre o genoma e o metabolismo, permitindo compreender o funcionamento de determinado organismo, através dos dados de expressão gênica e proteômica (Ihmels *et al.*, 2004; Kharchenko *et al.*, 2005; Pal *et al.*, 2005; Notebaart *et al.*, 2006). Devido às dificuldades dos métodos experimentais, diferentes abordagens computacionais foram desenvolvidas nos últimos anos para prever interações entre genes baseadas apenas em sequência genômica ou em combinação com dados experimentais (Date & Stoeckert, 2006). Entre estas metodologias podemos citar (i) o perfil filogenético ou “Interlog” que transfere a informação de interações entre ortólogos ou proteínas com alta similaridade de sequência, (ii) a metodologia “rosetta stone” (Bowers, *et al.*, 2004) que sugere que duas proteínas de um organismo tem alta chance de interação se existirem como um único gene abrangendo as duas sequências em outros genomas, o que indica uma forte atividade cooperativa entre estas proteínas e (iii) co-expressão conservada baseado na premissa que genes que interagem apresentam o mesmo padrão de expressão em diferentes condições (Bernstein *et al.*, 1977; Ihmels *et al.* 2004; Bowers *et al.*, 2004).

Muitas dessas redes biológicas têm sido reconstruídas para uma variedade de organismos patogênicos (Jamshidi & Palsson 2007; Plata *et al.*, 2010; Chavali *et al.*, 2012), dentre eles, podemos destacar a *Leishmania major*, agente da LT, no Velho Mundo (Chavali *et al.* 2008; 2012). Esses estudos permitem identificar possíveis alvos, de diversos processos intracelulares do organismo, que podem influenciar na virulência e desenvolvimento desses patógenos.

As redes biológicas já foram usadas para vários protozoários. Hans & Collins 2012 buscaram compreender melhor o metabolismo de *Giardia lamblia*, para identificar possíveis alvos terapêuticos. Considerando a resistência de algumas cepas de *Plasmodium falciparum*, à terapêutica disponível, foi realizada uma análise de balanço de fluxo com o objetivo de identificar genes essenciais, alvos para drogas, além de permitir a melhor compreensão da biologia do parasito (Plata *et al.*, 2010). Além disso, modelos biológicos permitiram um melhor entendimento da interação entre uma cepa de *Toxoplasma gondii* e sua capacidade de causar doença, e foi proposta a reconstrução da rede metabólica desse coccídeo (Song *et al.*, 2013).

Chavali *et al.*, 2008 apresentaram uma rede metabólica de *L. major* com 560 genes, 1112 reações e 1101 metabólitos. A comparação dessa rede, com a de humanos, permitiu a identificação de fatores únicos nesses tripanosomatídeos que podem estar associados à patogenicidade e virulência. Além disso, o conhecimento dessas diferenças pode auxiliar na descoberta de novos alvos de diagnóstico e terapêuticos. O diagnóstico rápido e eficaz possui alguns desdobramentos, dentre os quais podemos destacar o tratamento. Entretanto, a terapêutica das leishmanioses, muitas vezes, utiliza drogas caras ou tóxicas ou ambas, e frequentemente, requerem longos períodos de terapia. Nesse contexto, alguns estudos, utilizando as redes biológicas, buscam por novos alvos terapêuticos (Rezende *et al.*, 2012). Além disso, Flórez *et al.*, 2010 propuseram a exploração das redes de interações de proteínas de *L. major*, com interesse singular as cinases, proteínas importantes na sobrevivência do parasito, que poderiam revelar alvos para novos fármacos.

2 INTRODUÇÃO

Várias espécies de *Leishmania* são capazes de infectar o homem e provocar uma grande diversidade clínica da enfermidade. No Brasil, as espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (Vivax) braziliensis*, além de amplamente distribuídas, são consideradas as principais causadoras da leishmaniose tegumentar (LT), enquanto *L. (L.) infantum* é o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV). Acredita-se que proteínas figuram dentre os fatores do parasito que podem estar associados à determinação das formas clínicas, uma vez que as diferenças biológicas entre organismos que compartilham um genoma semelhante podem estar associadas a variações nos níveis de proteínas entre estes organismos. Embora uma grande quantidade de proteínas possam apresentar quantificação diferencial, o entendimento completo dos processos pode ser laborioso devido ao grande volume de dados e a anotação das proteínas ser falha para indicar todos os processos biológicos da qual elas participam. Considerando que proteínas com potencial de interação física entre si possuem maior probabilidade de participarem de um mesmo processo biológico, integração de dados de proteômica em redes de interação proteína-proteína podem auxiliar a compreensão do funcionamento de determinado organismo. Essa associação é muitas vezes expressa através das redes biológicas.

Além disso, o conhecimento dos processos biológicos, dos quais participam as proteínas, pode permitir a identificação de possíveis fatores associados à patogenicidade, virulência, mecanismos de infecção e sobrevivência no hospedeiro, alvos para drogas, antígenos para testes de diagnóstico e compostos vacinais, além de permitir a melhor compreensão da biologia do parasito.

Por outro lado, o diagnóstico preciso das leishmanioses, tem implicação em diversos aspectos clínicos e epidemiológicos, como por exemplo, avaliação das medidas de controle, eficácia de tratamento, diminuição da morbi-mortalidade, dentre outros. Alguns dos métodos utilizados para o diagnóstico das leishmanioses, apesar da sensibilidade satisfatória, apresentam baixa especificidade, sendo esta uma das principais desvantagens dos métodos que utilizam antígenos não purificados, não sendo incomum a reatividade cruzada com outras parasitoses. Nesse contexto antígenos purificados sintéticos ou recombinantes têm sido identificados com objetivo de melhorar o diagnóstico sorológico dessa parasitose. No entanto, esses testes são pouco empregados

no diagnóstico da LT devido a uma fraca resposta humoral nessa forma da doença, resultando em uma baixa sensibilidade do teste (Kar, 1995; Goto & Lindoso, 2010; Vries *et al.*, 2015). Contudo, estudos recentes sugerem que a incorporação de antígenos recombinantes purificados de *Leishmania* pode ajudar a resolver essas questões.

Além disso, sabemos que a ativação de células B e T e, conseqüentemente, a produção de anticorpos estão, comumente, associadas a estimulação por proteínas abundantes e imunogênicas (Shreffler *et al.*, 1993; Rafati *et al.*, 2007; Khare *et al.*, 2016). Essas podem, então, constituir candidatos potenciais para utilização em testes sorológicos e vacinas. As proteínas e/ou epitopos selecionados têm sido utilizadas como antígenos em métodos de diagnóstico sorológico, de forma eficiente, principalmente, para LV (Shreffler *et al.*, 1993; Leifso *et al.*, 2007; Salles *et al.*, 2017). Entretanto, a aplicação para a forma tegumentar da doença é limitada devido à baixa sensibilidade e especificidade variável dos testes disponíveis, atualmente.

3 JUSTIFICATIVA

A busca por novos antígenos é importante para o desenvolvimento de um método de diagnóstico mais rápido e preciso das leishmanioses. Dessa forma, para contribuir com o entendimento da biologia das espécies de *Leishmania* mais prevalentes e amplamente distribuídas em nosso país, utilizamos uma abordagem proteômica para identificação de proteínas diferencialmente abundantes entre *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*. Essas proteínas diferencialmente abundantes entre as espécies podem estar associadas a uma série de processos biológicos, inclusive com a estimulação da resposta imunológica dos hospedeiros vertebrados. Assim, decidimos avaliar se essas proteínas são reativas a soros de pacientes com as diferentes formas clínicas das leishmanioses e, sobretudo, quais as proteínas em que há correlação entre espécie e forma clínica da doença, permitindo identificar antígenos promissores para o desenvolvimento de um teste sorológico para diagnóstico da LT.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Identificar proteínas diferencialmente abundantes e antigênicas em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) infantum*.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar e categorizar proteínas diferencialmente abundantes entre *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Identificar potenciais fatores de virulência e sobrevivência de *Leishmania infantum*, permitindo estabelecer as diferenças dessa espécie em relação a espécies causadoras da LT humana no Novo Mundo.
- Selecionar e identificar proteínas antigênicas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Selecionar epitopos para células B a partir das proteínas mais abundantes e antigênicas;
- Avaliar a reatividade dos epitopos com os soros de pacientes com LT e LV em imunoenensaio.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Primeiramente, identificamos as proteínas diferencialmente abundantes entre *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Em seguida, categorizamos essas proteínas e montamos as redes biológicas para cada uma das espécies. Posteriormente, selecionamos dentre as proteínas diferencialmente abundantes quais eram também antigênicas. Para estas proteínas foi feita a predição dos epítomos B e a seleção dos peptídeos potenciais para o diagnóstico sorológico da LT. O delineamento experimental está resumido na figura 1.

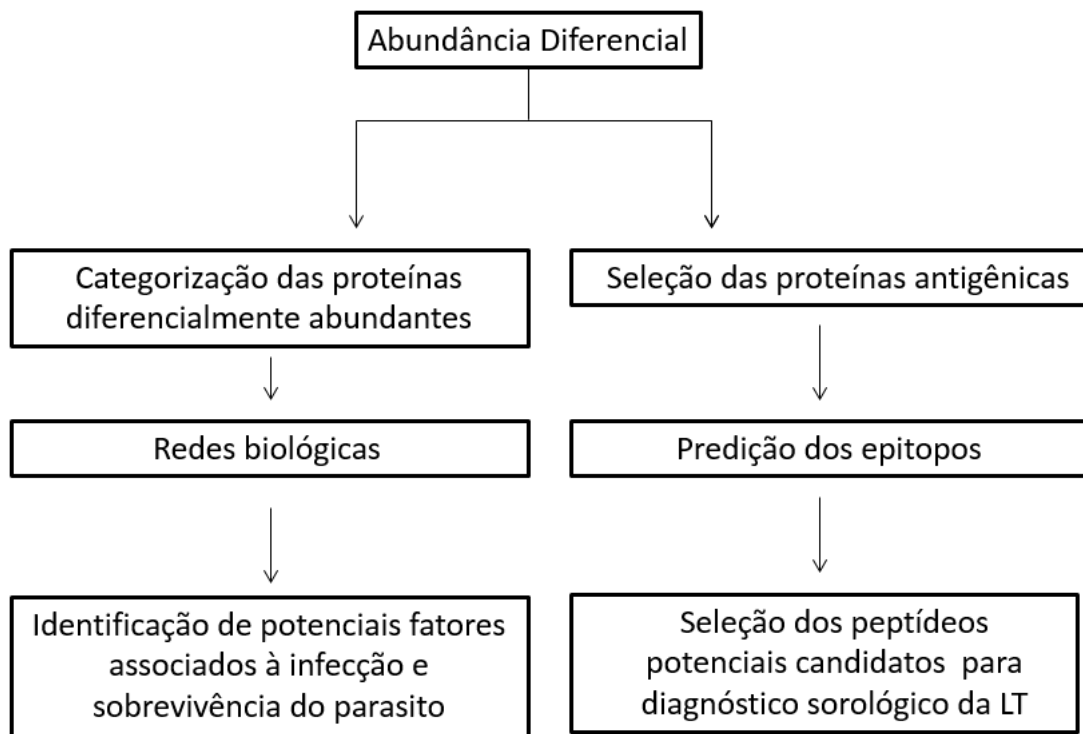


Figura 1: Delineamento experimental.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto teve aprovação na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep) do Ministério da Saúde – CAAE: 30429114.1.3001.5091.

6.1 Parasitos/ extrato protéico

Formas promastigotas de *L. amazonensis*, cepa: IFLA/BR/1967/PH8, *L. braziliensis*, cepa: MHOM/BR/1975/M2904 e *L. infantum*, cepa: MHOM/BR/1972/BH46 foram cultivadas e mantidas em meio LIT, suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico, em estufa B.O.D a 26 °C. Foram realizados repasses sucessivos para o crescimento das culturas, e para cada espécie de *Leishmania* foram obtidos no mínimo três cultivos independentes e simultâneos na fase exponencial de crescimento, a fim de normalizar a variabilidade biológica nos experimentos posteriores.

A extração de proteínas foi realizada ressuspendendo os parasitos em tampão de lise (8 M uréia, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 65mM dithiothreitol (DTT), 40 mM Tris base, e 1% de “MIX” de inibidor de protease, GE Healthcare, San Francisco,CA). Em seguida, as amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação de 2000 RPM. Após esse período, a solução passou por um processo de lise mecânica utilizando uma agulha 26G. O conteúdo foi, então, centrifugado por 30 minutos a 10000 RPM e o sobrenadante aliquoteado e acondicionado no freezer -70°C. As proteínas foram dosadas usando o 2D-Quant kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

6.2 Eletroforese bi-dimensional- 2-DE

Para análise do perfil proteômico entre as espécies, inicialmente foi feita a avaliação da qualidade e reprodutibilidade dos géis 2-DE e em seguida os parâmetros determinados foram utilizados na análise de expressão diferencial (DIGE).

a) Avaliação da qualidade e reprodutibilidade das amostras

Géis 2-DE provenientes de três cultivos independentes, de cada uma das espécies estudadas, foram preparados e o coeficiente de correlação entre as amostras biológicas de cada espécie foi calculado.

Amostras protéicas foram diluídas em tampão IEF (8M Uréia, 2M Tiouréia, 4% CHAPS, 0,0025% Azul de Bromofenol), e 900 µg de proteínas foram adicionadas nas *strips* de 18 cm, contendo 1 % de IPG buffer (Immobiline™ DryStrip, pH 4–7, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Após hidratação passiva, a focalização isoeletrica se deu com os seguintes parâmetros: passo 1 - 500V por 6h; passo 2 - 1000V por 1h e 30min; passo 3 – 8000V por 2h; passo 4 –8000V, até acumular 40000Vh; passo 5 – 500V por 1 h; passo 6 – 500V(hold). Após a focalização isoeletrica, as *strips* foram equilibradas com Tampão de Equilíbrio (50 mM de Tris 1,5M pH 8,8, 6M Uréia, 30% Glicerol, 2% SDS, 0,001% Azul de Bromofenol) contendo 10mg/mL de DTT (Ditiotreitol) por 15 minutos sob leve agitação. E posteriormente, com Tampão de Equilíbrio contendo 25mg/mL de IAA (Iodoacetamida) nas mesmas condições. As *strips* foram então transferidas para um gel de poliacrilamida a 12% para eletroforese nas seguintes voltagens: 50 volts/gel e 25mA/gel por 15 minutos e 100 volts/gel e 50mA/gel até o fim da corrida.

As imagens dos géis corados pelo coomassie G-250 (Neuhoff, 1988) foram digitalizadas utilizando *ImageScanner* (AmershamBiosciences) e analisadas através do programa *Image Master 2D Platinum 5.0* (GEHealthcare) para identificar os índices de correlação entre as imagens. Os *spots* foram detectados pelo programa a partir da definição dos seguintes parâmetros: *smooth*, área mínima, saliência; e posteriormente foi feita a edição manual, para eliminação de artefatos, erroneamente detectados. Em seguida, foi realizada a sobreposição das imagens para fazer o *match*, e, posteriormente, por meio do programa *ImageMaster* foi calculada a intensidade e o volume relativos normalizados para cada *spot*.

b) Differential Gel Electrophoresis (DIGE)

A técnica Gel de Eletroforese Diferencial foi utilizada para avaliar a abundância diferencial das proteínas entre *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

O *pool* dos extratos protéicos de promastigotas de cada uma das espécies foram marcados com o fluoróforo CyDye™ (GE Healthcare), conforme o delineamento experimental (tabela 1). A marcação das proteínas foi realizada de modo a ocorrer a

inversão das amostras com diferentes fluoróforos (*DyeSwab* com *Cy3* e *Cy5*), e para normalização dos dados, uma mistura em iguais quantidades de todas as amostras foi marcada com o fluoróforo *Cy2*, sendo este o padrão interno.

Para a marcação foi utilizado 400 pmol de cada fluoróforo (*Cy2*, *Cy3* e *Cy5*) e 150ug de proteína. As amostras marcadas foram homogeneizadas, centrifugadas e mantidas no gelo por 30 minutos. Posteriormente, foi acrescentado 1µl de L-Lisina 10 mM e, foram mantidas no gelo por 10 minutos, sob o abrigo da luz. As amostras foram, então, tratadas com 2% de dithiothreitol (DTT), 1 % de IPG buffer em tampão de amostra (7M Uréia, 2M Tiouréia, 4% CHAPS) e incubado por 10 minutos no gelo sobre o abrigo de luz. Esta solução foi aplicada em *strips* de 18 cm (Immobiline™ DryStrip, GE Healthcare) com pH 4–7 durante 12 horas, para hidratação passiva. Em seguida, procedeu-se a separação eletroforética (os 5 géis juntos) de acordo com protocolo descrito anteriormente. Imediatamente após a eletroforese, os géis foram digitalizados usando *Typhoon Trio* (GE Healthcare Inglaterra) com excitação/emissão de comprimentos de onda específicos para *Cy2* (488/520 nm), *Cy3* (532/580 nm) e *Cy5* (633/670 nm). As imagens foram analisadas no programa DeCYDER (GE Healthcare) e os géis foram, posteriormente, corados por comassie (Coomassie Brilliant Blue G – 250) (Neuhoff, 1988), para a excisão manual dos *spots* selecionados.

Tabela 1: Esquema de marcação com CyDye dos extratos protéicos de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Corante Gel	Cy3 (extrato)	Cy5 (extrato)	Cy2 (extrato)
Gel 1	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	Mix das amostras*
Gel 2	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. infantum</i>	Mix das amostras*
Gel 3	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	Mix das amostras*
Gel 4	<i>L. infantum</i>	<i>L. amazonensis</i>	Mix das amostras*
Gel 5	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. amazonensis</i>	Mix das amostras*

* *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*

6.3 Análise dos géis DIGE

Os géis DIGE foram analisados utilizando o *software DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v 7.2* (GE - Healthcare). Esse *software* é dividido em módulos, sendo eles: *Image Loader*, *Organizer*, *Differential in-gel Analysis (DIA)*, *Biological Variation Analysis (BVA)*, e o *Extended Data Analysis (EDA)*, conforme exemplificado na Figura 2.

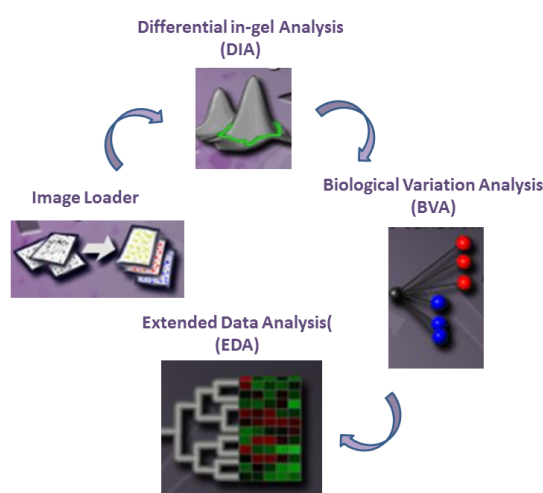


Figura 2: Esquema de análise do *software DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.2* (GE - Healthcare). O software é dividido em 4 módulos principais: *Image Loader*, *Differential in-gel Analysis (DIA)*, *Biological Variation Analysis (BVA)*, e o *Extended Data Analysis (EDA)*.

Inicialmente, no módulo *Image Loader* ocorreu a edição das imagens, que em seguida foram agrupadas no módulo *Organizer*. No *Differential in gel Analysis (DIA)* os *spots* foram detectados e quantificados de acordo com os seguintes parâmetros: *slope*, volume, área e o tamanho do pico. Para eliminação de artefatos, detectados como *spots*, foram desconsiderados aqueles que apresentaram $slope \geq 0,87$ e área ≤ 350 .

As imagens foram exportadas para o *Biological Variation Analysis (BVA)*, e no modo *Spot Map Mode* foi inserido o desenho experimental que permitiu a realização das análises estatísticas posteriores. A análise comparativa foi feita no *Match Mode*, a partir da sobreposição das imagens dos géis. No modo *Protein Mode* é possível visualizar

diversos dados dos *spots* (massa molecular e ponto isoelétrico), bem como valores de testes estatísticos (*One-Way ANOVA*, *Two-Way ANOVA* e *Test T Student*). Essas informações permitem filtrar somente os *spots* de interesse, como por exemplo, aqueles estatisticamente significativos em relação a sua intensidade. A sobreposição das imagens das três espécies estudadas para a seleção dos *spots* diferencialmente intensos foi realizada no *Match Mode*. Posteriormente os *spots* selecionados foram submetidos a testes estatísticos: *One-Way ANOVA* e *Test T Student*, no *Protein Mode*, e considerados como diferencialmente intensos, quando $P \leq 0,05$.

Os *spots* selecionados como diferencialmente intensos foram retirados dos géis, processados e identificados por espectrometria de massas MALDI-ToF/ToF.

6.4 Identificação das proteínas (MALDI – TOF/TOF)

Os *spots* de interesse foram retirados dos géis e processados individualmente. Para descoloração dos fragmentos, foram realizadas três lavagens de 15 minutos, utilizando 400µl de bicarbonato de amônio a 25mM e 50% v/v de acetonitrila, sob agitação constante. Em seguida, os fragmentos de géis foram desidratados com acetonitrila PA por 5min. Após remoção da acetonitrila e secagem dos fragmentos, os mesmos foram reidratados com 10µl de tripsina (Promega), a 20 ng/µl em 25mM de bicarbonato de amônio por 16 h a 37°C, para a digestão das proteínas. Posteriormente, os peptídeos tripsinizados foram extraídos através da lavagem com 30µl de acetonitrila 50%/ácido fórmico 5% por duas vezes, por 15 minutos, sob agitação constante. Em seguida, o volume dessa solução foi reduzido em SpeedVac (Savant) a um volume de aproximadamente 10µl. Por fim, as soluções concentradas de cada um dos *spots* foram dessalinizadas utilizando coluna C18 de troca reversa Zip-Tip® (C18 resina; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA). Os peptídeos foram eluídos da coluna com solução de acetonitrila 50% /ácido trifluoracético 0,1% e congelados a -20°C até o momento do uso.

As amostras foram, então, misturadas à matriz [10mg/mL de R-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Aldrich, Milwaukee, WI) em acetonitrila 50%/ácido trifluoracético 0,1%] e aplicadas na placa *MTP AnchorChip™ 600/384* (Bruker Daltonics) para análise por MALDI/ToF-ToF (Bruker, AUTOFLEX, 3.0). Ambos MS e MS/MS foram adquiridos com o

laser neodymium-doped yttrium aluminum garnet (Nd:YAG) com 200-Hz. Os espectros foram editados usando os programas FlexAnalysis e Biotoools. A busca foi realizada através do programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), usando o banco de dados do *National Center for Biotechnology* (NCBI). Os parâmetros de busca foram: tolerância de desvio de massa molecular entre 100-200ppm, carbamidometilação, máximo de um sítio tríptico de corte não clivado e oxidação da metionina. Apenas proteínas com valores de *score* $P \leq 0,05$ foram consideradas.

6.5 Análises de Bioinformática e identificação de processos biológicos associados com proteínas diferencialmente abundantes

Inicialmente, a diferença entre o perfil global de proteínas das diferentes espécies foi analisada através da construção de um *heatmap* utilizando o pacote *gplots* e *heatmap2* implementado na plataforma R (Core Team, 2013).

Para avaliar as potenciais relações das proteínas diferencialmente abundantes na participação das modulações de processos biológicos, foram preditas redes de interações proteína-proteína entre todas as proteínas identificadas como diferencialmente presentes em uma determinada espécie em relação às outras duas. Sequências “*fasta*” de cada proteína foram primeiramente recuperadas do banco de dados TriTrypDB (Aslett *et al.*, 2010) versão 30, e foram utilizadas como arquivo de entrada na ferramenta de busca do banco de dados STRING (Szklarczyk *et al.*, 2015) versão 10.0, utilizando um valor de corte de interação de 0,7. As redes construídas foram posteriormente visualizadas e analisadas no programa Cytoscape versão 3.3.4 (Cline *et al.*, 2007).

Para análise de enriquecimento de função biológica associada às proteínas diferencialmente abundantes, inicialmente os termos de ontologia gênica (GO) para todas as proteínas do proteoma de cada espécie foram identificados utilizando a ferramenta Goanna implementada no website AgBase (Mccarthy *et al.*, 2006). A busca por GO foi realizada utilizando o programa BLASTp (Altschul, 1997) contra o banco de dados SwissProt (Boutet *et al.*, 2016) utilizando um valor esperado de 10^{-5} , tamanho da palavra (*word size*) igual a 3, matriz de substituição BLOSUM62 e filtro de baixa complexidade ligado (Mendes *et al.*, 2013). Os termos de GO relacionado a processos

biológicos mais significativos para cada rede de interação proteína-proteína foi identificado utilizando o método de distribuição hipergeométrica, com correção de valor de probabilidade pelo método de taxa de falsas descobertas (FDR - false discovery rate) para minimização de resultados falsos positivos. Esta análise de GO foi realizada utilizando o pacote BINGO, (Maere *et al.*, 2005) implementado no programa Cytoscape e foi considerado significativo um processo biológico com valor-p corrigido menor que 0,05.

6.6 Imunoproteômica

Os soros utilizados nesse estudo foram cedidos pelo colaborador do projeto Dr. Edward José Oliveira, pesquisador do Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou. Constam 30 soros de indivíduos saudáveis (exclusão pelo ELISA rK39), 30 soros de pacientes diagnosticados com LT (exame clínico e RIFI) e 30 soros de pacientes diagnosticados com LV (exame clínico e DAT-LPC). Para realização dos experimentos foram feitos *pools* do total de soros de cada uma das três condições citadas; para cada condição (forma clínica) foram utilizados 20µl de cada amostra, totalizando 600µl para cada *pool*.

A seleção de *spots* imunogênicos nos extratos protéicos das espécies de *Leishmania* utilizadas foi realizada em 2 etapas: a) padronização do western blot e b) western blot a partir de géis 2-DE.

a) Padronização do Western blot

A padronização da reação foi realizada com extratos protéicos fracionados por SDS-PAGE. Vinte microgramas do extrato protéico, de cada uma das três espécies estudadas, foi separado através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, seguida de transferência para membrana de nitrocelulose, 0.45 µm AmershamHybond – ECL, utilizando o equipamento Semidry-transfer Unit (GE Healthcare). As membranas foram, então, incubadas com solução de bloqueio (5% de leite desnatado Mólico em 20mM de Tris e 500mM de NaCl, ph 7.4) a 4°C por 18 horas. A membrana foi separada em tiras, individualizando cada canaleta, e essas foram incubadas com os *pools* de soros de

pacientes com LT e LV e *pool* de soros de indivíduos não infectados (controle) nas diluições 1:160, 1:320 e 1:640, em solução de bloqueio. O anti-IgG humano conjugado com peroxidase foi avaliado nas diluições 1:100.000 e 1:200.000 em solução de bloqueio. Por fim, a revelação foi realizada, com todas as membranas ao mesmo tempo, através de quimioluminescência, com o cromógeno ECL Plus™ (GE healthcare), com tempo de exposição de 1 minuto.

b) Western blot a partir de géis 2-DE

Após a determinação das melhores condições do western blot, a seleção de proteínas antigênicas foi realizada a partir de fracionamento dos extratos proteicos por 2DE, descrita anteriormente (5.6-a), transferidos para membrana de nitrocelulose, 0.45 µm AmershamHybond – ECL, utilizando o equipamento Semidry-transfer Unit (GE Healthcare) e, então, reveladas para as três condições de soros (LT, LV e controle), conforme a padronização. As membranas foram digitalizadas utilizando *ImageScanner* (AmershamBiosciences) e as imagens analisadas através do programa *Image Master 2D Platinum 5.0* (GEHealthcare), que permite a normalização do *background* e o cálculo do número de *spots* e da intensidade dos mesmos. A partir da sobreposição das imagens das membranas reveladas no WB (utilizando como referência os marcadores de ponto isoelétrico-pI e de massa molecular-MM) com os géis DIGE, foi determinada a posição dos *spots* imunogênicos e que também apresentaram diferença de intensidade e conseqüentemente a identificação das proteínas correspondentes.

6.7 Predição de epitopos lineares de células B

As proteínas selecionadas para esta análise atendiam a dois critérios: reatividade no western blot exclusivamente para uma das formas clínicas e aumento de abundância numa espécie em relação às outras.

As seqüências de aminoácidos das proteínas foram adquiridas nos bancos de dados no NCBI, através do número de acesso de cada uma delas. Posteriormente, essas seqüências foram submetidas aos *softwares*: BCPreds (<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds>) e ABCPred

(<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred>). Esses programas usam modelos matemáticos que prevêm a localização de epitopos lineares de células B, através da comparação de sequências e propriedades físico-químicas de epitopos previamente identificados em diferentes modelos (Yang & Yu 2009). Além disso, são consagrados pela literatura (Saha & Raghava 2006; El-Manzalawy *et al.*, 2008; Meens *et al.* 2009).

Os parâmetros usados para a predição dos epitopos foram comprimento de até 14 aminoácidos e *Threshold* de 0,80 para ABCPred ou 80% para BCPreds. Foram considerados aqueles que apresentaram predição pelos dois *softwares* simultaneamente, e que tivessem tamanho entre nove e 14 aminoácidos, devido à abertura da fenda dos anticorpos na qual se ligam os epitopos que comporta aproximadamente 10 aminoácidos (Lopes, 2006).

Além disso, uma pesquisa foi realizada no GeneDB (<http://www.genedb.org/>) para verificar a homologia dos epítopos mapeados em relação aos seus ortólogos em *T. cruzi*, através do Blastp.

6.8 Imunoensaio em técnica de *spot* síntese

Os peptídeos selecionados por análise de bioinformática foram submetidos à síntese em membrana (“*spot* síntese”) no aparelho ResPep SL (IntavisAG, Bioanalytical Instruments).

A síntese dos peptídeos em fase sólida iniciou-se pelo C-terminal do último aminoácido das seqüências estabelecidas. O Fmoc, grupamento protetor, foi desligado pela adição de piperidina 20% em dimetilformamida (DMF), e as funções aminas foram recuperadas, e assim, puderam reagir com o aminoácido a ser acoplado. O monitomaneto das reações de ligação se deu por alteração de coloração dos *spots*, devido à reação de azul de bromofenol, demonstrando ausência de aminas livres e, portanto, confirmando o acoplamento. Usamos anidrido acético 10% em DMF a fim de evitar reações colaterais de funções NH₂ livres ou que não reagiram com os aminoácidos posteriormente adicionados, evitando a formação de sequências erradas ou ligações indesejáveis. Os grupos laterais dos aminoácidos foram desprotegidos com ácido trifluoracético (TFA) associado a diclorometano e trietilsilano, ao final da síntese.

As membranas de celulose contendo os peptídeos (três replicatas) foram lavadas por cinco minutos com PBS pH 7,4, por três vezes. Posteriormente, foram incubadas com solução de bloqueio (PBS/T 0,1%, 3% de BSA e 5% de sacarose), por 18 horas. Após lavagem de 10 minutos com PBS/T 0,1%, cada replicata de membrana foi incubada por duas horas, sob agitação constante com um dos *pools* de soros (pacientes com LT, pacientes com LV e de indivíduos saudáveis) diluídos em solução de bloqueio, nas concentrações de 1:160, 1:640 e 1:160, respectivamente. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com PBS/T 0,1%, e incubadas com solução de bloqueio contendo o anticorpo conjugado com peroxidase diluído a 1:100.000. As membranas foram, então, lavadas três vezes, de 10 minutos cada, com PBS/T 0,1%, seguida pela revelação com ECL.

Com propósito de reutilizar as membranas após revelação por quimioluminescência, as membranas foram submetidas a um tratamento de regeneração. A retirada dos complexos moleculares ligados aos peptídeos foi realizada com solução contendo uréia (8 M), SDS (1%) e β -mercaptoetanol (0,1%). Procedeu-se, então, lavagens com etanol (50%) e ácido acético (10%), para remoção da uréia. A fim de minimizar a hidratação dos peptídeos ao final do processo, as membranas foram lavadas com metanol e armazenadas a - 20°C, após secarem. Estes procedimentos permitiram a reutilização das membranas sem redução da reatividade (Tabela 2).

A intensidade relativa (IR) da reação dos soros com cada peptídeo foi determinada pela razão dos valores de intensidade de um mesmo peptídeo com os *pools* dos soros utilizados, por meio do *software* Image J. Foram selecionados todos os peptídeos com IR superior a 2,0 em relação ao controle e entre as formas clínicas.

Tabela 2: Esquema de utilização das membranas e dos *pools* de soros de pacientes diagnosticados com Leishmaniose Visceral (LV), Leishmaniose Tegumentar (LT) e soros de indivíduos saudáveis (Controle).

Experimento	1	2	3
Membrana	<i>Pool</i> de soros	<i>Pool</i> de soros	<i>Pool</i> de soros
1	LT	Controle	LV
2	LV	LT	Controle
3	Controle	LV	LT

7 RESULTADOS

7.1 Análise da reprodutibilidade dos Géis 2-DE

Para cada uma das espécies, foram confeccionados três géis 2-DE de 18 cm, pH 4 - 7, contendo 900ug de proteínas de extratos protéicos distintos para cada espécie. A partir desses géis, foi avaliada a reprodutibilidade entre as amostras, através do programa *Image Master 2D Platinum 6.0* (GE Healthcare).

As Figuras 3, 4 e 5 representam subsequentemente os géis obtidos para as espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Observamos que os perfis protéicos apresentaram alta reprodutibilidade nas três espécies estudadas, principalmente em relação ao número, intensidade e distribuição dos *spots* nos géis. Os géis 2-DE dos extratos de *L. amazonensis* apresentaram uma média de 843 *spots* e índice de correlação de 0,81 (Figura 3). Para *L. braziliensis* a média de *spots* visualizados foi de 938 e índice de correlação entre os géis de 0,93 (Figura 4); e nos géis de *L. infantum* foi observada uma média de 1082 *spots* com índice de correlação de 0,90 (Figura 5). Os gráficos com os índices de correlação podem ser observados na figura 6. Nessa análise, os índices de correlação com valores próximos a 1 significam 100% de correlação entre as posições relativas dos *spots* nos géis, e esse índice é aceitável quando $> 0,8$ (Weiss & Görg, 2007).

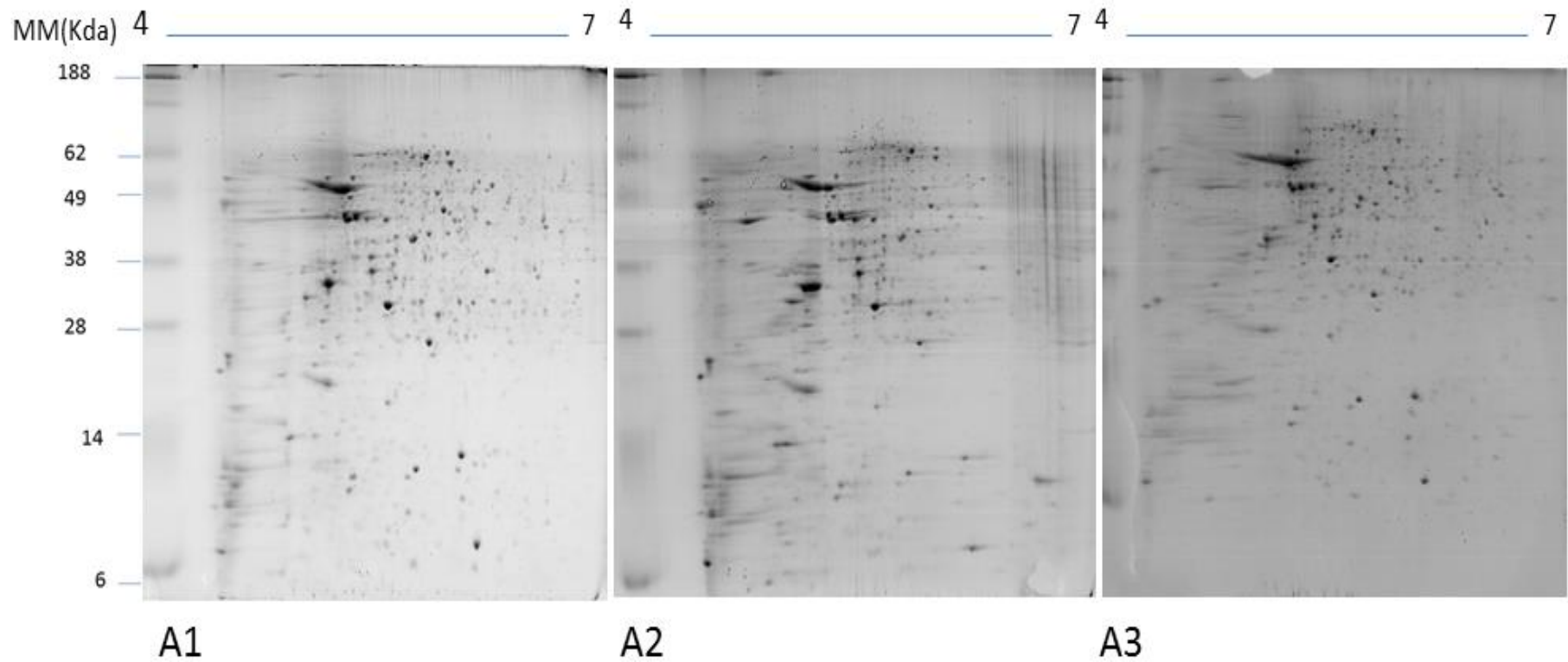


Figura 3: Imagem representativa dos Géis 2-DE de *L. amazonensis*. SDS-PAGE 12%, corado por Comassie Brilliant blue G250, obtido a partir de tiras de 18 cm, pH 4-7, hidratadas com 900ug de extrato protéico de *L. amazonensis*. A1, A2 e A3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L. amazonensis*.

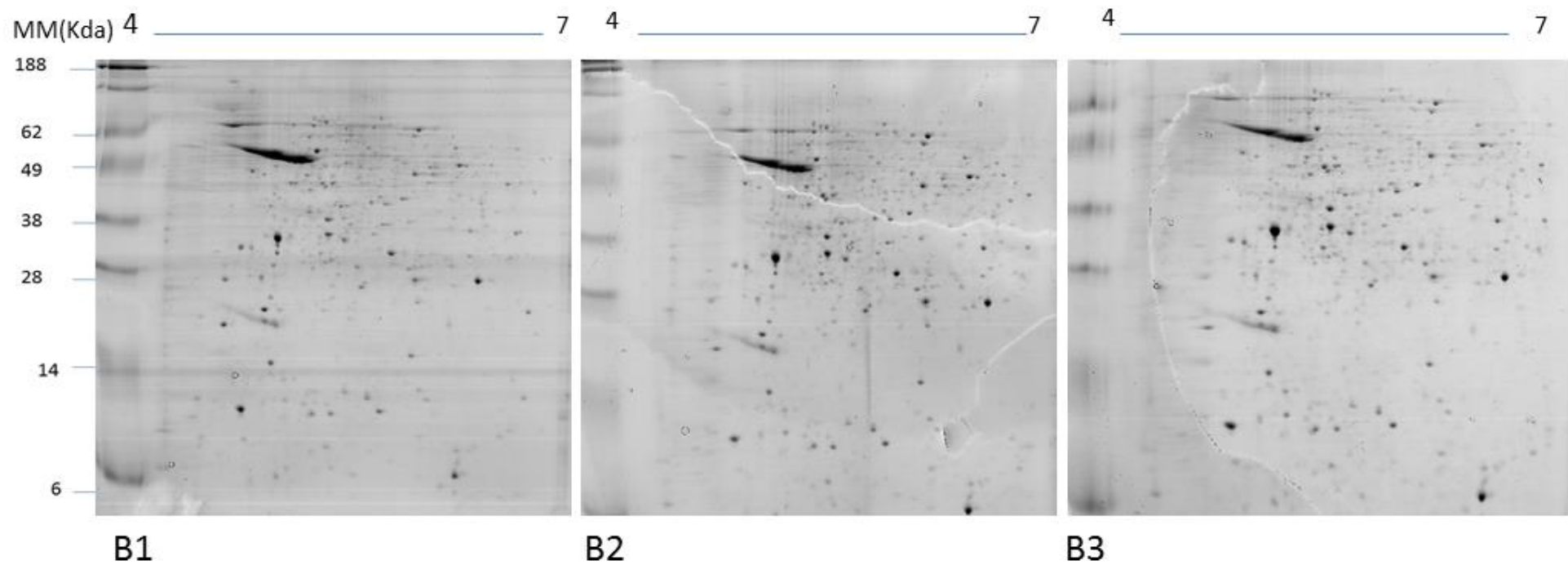


Figura 4: Imagem representativa dos Géis 2-DE de *L. braziliensis*. SDS-PAGE 12%, corado por Comassie Brilliant blue G250, obtido a partir de tiras de 18 cm, pH 4-7, hidratadas com 900ug de extrato protéico de *L. braziliensis*. B1, B2 e B3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L. braziliensis*.

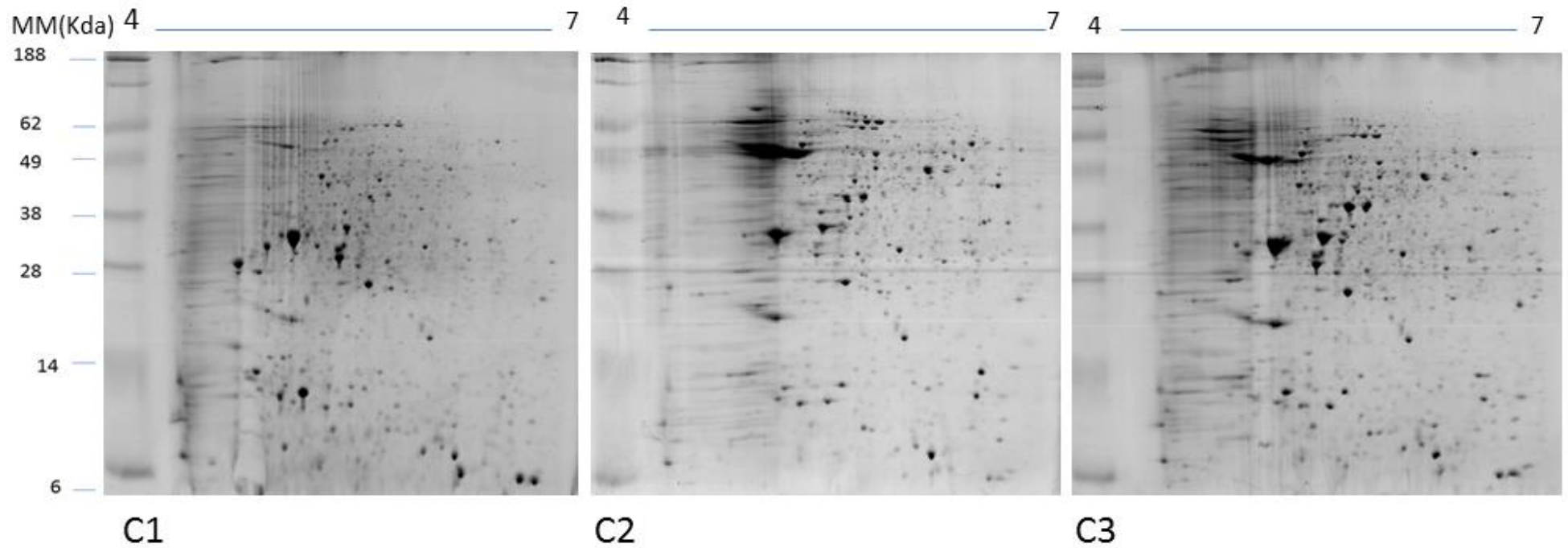


Figura 5: Imagem representativa dos Géis 2-DE de *L. infantum*. SDS-PAGE 12%, corado por Comassie Brilliant blue G250, obtido a partir de tiras de 18 cm, pH 4-7, hidratadas com 900 ug de extrato protéico de *L. infantum*. C1, C2 e C3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L. infantum*.

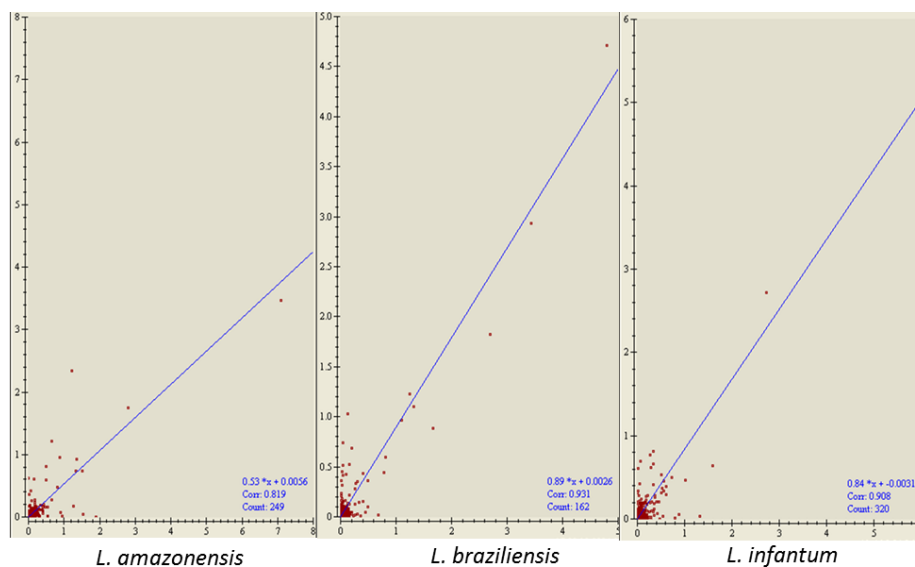


Figura 6: Índice de correlação. Figura representativa do *Scatter Plot* da comparação da porcentagem do volume de cada *spot* (eixo x) nos géis das triplicatas, em relação ao gel de referência (eixo y), para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

7.2 Differential Gel Electrophoresis (DIGE)

Para selecionar proteínas diferencialmente abundantes entre as espécies, os extratos protéicos de cada uma delas foram previamente marcados com fluoróforos e, em seguida, fracionados em tiras de 18 cm, pH 4-7, seguido de PAGE. Imagens dos géis foram obtidas no aparelho *Typhoon FLA 9000* (GE-Healthcare) e analisadas utilizando o software *DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v 7.2* (GE - Healthcare).

Após edição das imagens e refinamento dos parâmetros, observamos um número de *spots/gel* de 1154 *spots* para *L. amazonensis*, 1095 *spots* para *L. braziliensis* e 1216 *spots* para *L. infantum*. Em relação a cada conjunto de géis fluorescentes, observamos: 1119 *spots/imagem* no Gel 1, 1127 para o Gel 2, 1308 para o Gel 3, 1305 para o Gel 4 e 1039 para o Gel 5. Uma imagem de sobreposição dessas marcações foi gerada para cada um dos cinco géis. Uma imagem representativa desse experimento é mostrada na Figura 7.

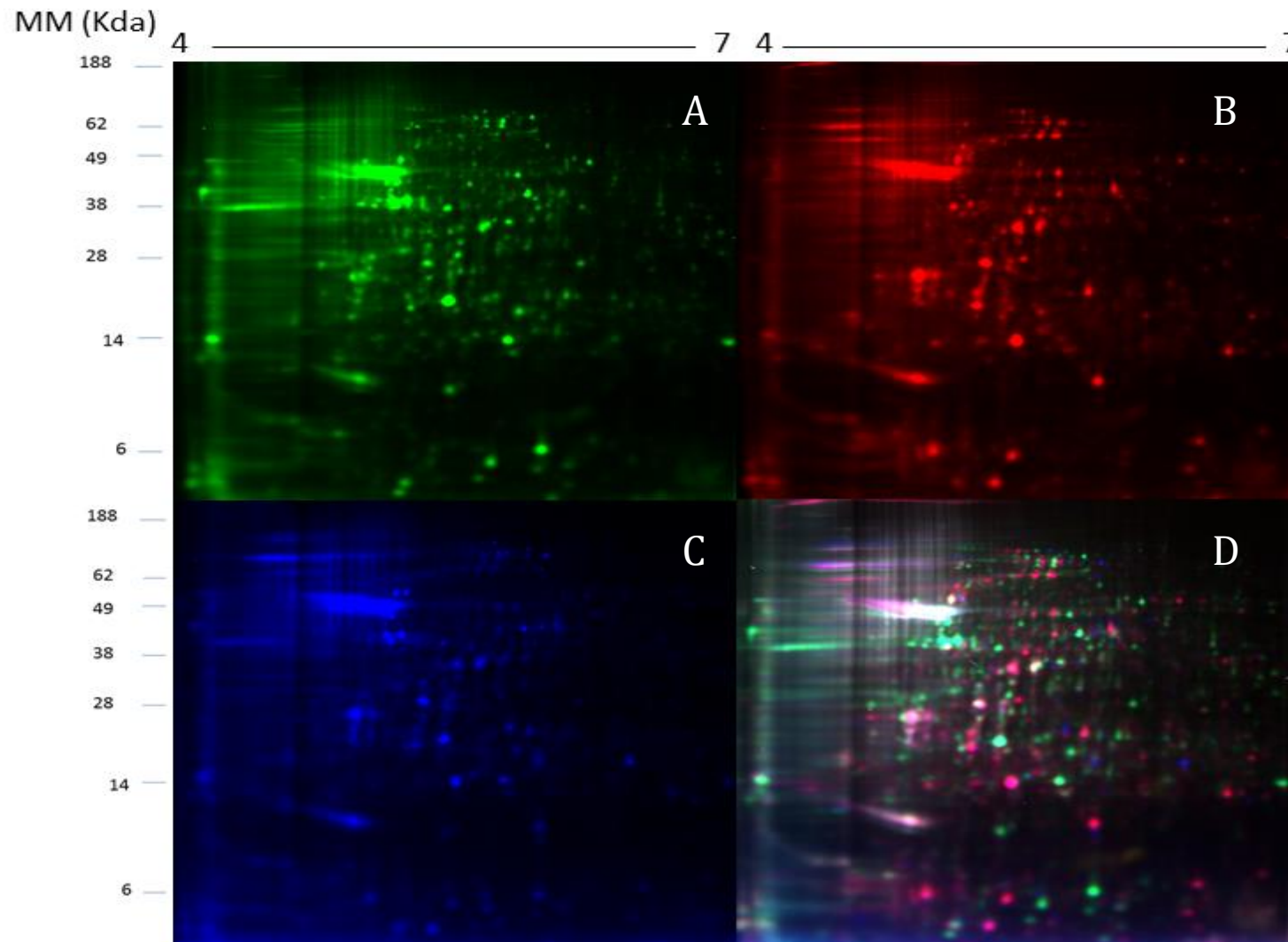


Figura 7: Imagem representativa da eletroforese diferencial (DIGE). Géis obtidos a partir de tiras de 18 cm, pH 4 – 7, SDS-PAGE 12%, contendo 50 µg de proteína de cada amostra. A – Mix das amostras (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*) marcadas com Cy2 utilizado para a normalização, sendo o controle interno da reação; B – Extrato protéico de *L. braziliensis* marcado com Cy5; C - Extrato protéico de *L. amazonensis* marcado com Cy3 e D – Sobreposição das 3 imagens (Cy2, Cy3 e Cy5) do Gel fluorescente 1.

A sobreposição desses *spots*, processo chamado de *match*, foi realizada no módulo BVA e os valores de *match* obtidos foram de aproximadamente 80%, sendo estes aceitáveis de acordo com Weiss & Görg, 2007. A diferença de intensidade entre os *spots* foi avaliada através dos testes estatísticos *T Student* e *One-Way ANOVA* ($P \leq 0,05$).

Na Figura 8, está representada uma visão 3D de *spots* com diferença de intensidade em cada uma das espécies em relação as outras.

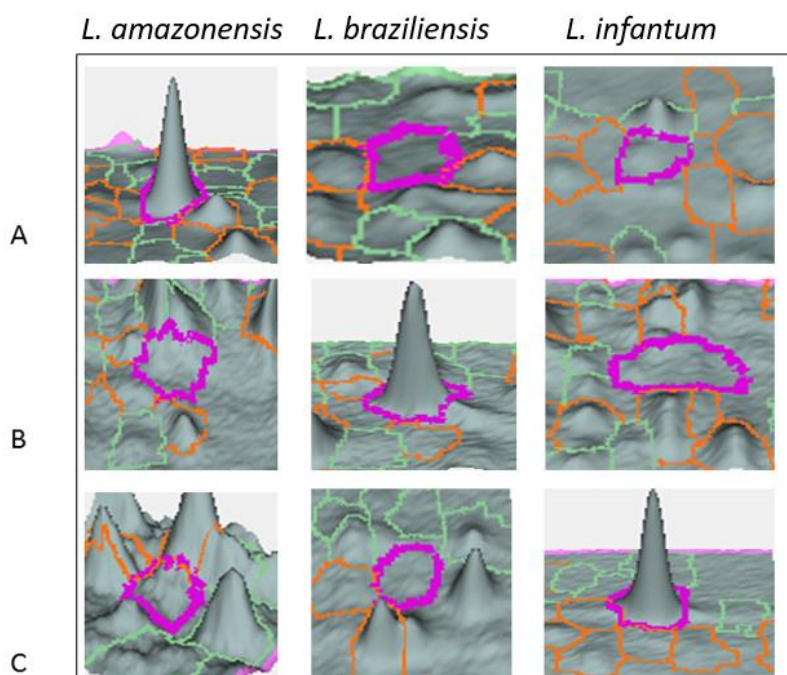


Figura 8: Visão 3D de *spots* selecionados com diferença de intensidade nas espécies de *Leishmania*. São mostradas as regiões do gel correspondentes ao *spot* representado (circulado em púrpura) e uma imagem tridimensional representativa da intensidade do *spot*. Em A está representado um *spot* com aumento da intensidade em *L. amazonensis* em relação a *L. braziliensis* e *L. infantum*. Em B está representado um outro *spot* com aumento da intensidade em *L. braziliensis* em relação a *L. amazonensis* e *L. infantum*. Em C está representado um outro *spot* com aumento da intensidade em *L. infantum* em relação a *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

As análises revelaram um total de 338 *spots* com diferença de intensidade, sendo 139 de *L. amazonensis*, 95 de *L. braziliensis* e 104 de *L. infantum*. Durante o processo de excisão manual dos *spots* foram recuperados: 131, 91 e 99 *spots*, de cada um dessas

espécies, respectivamente. Esses *spots* foram, então, submetidos à Espectrometria de Massas, e identificados 113 (86%) *spots* para *L. amazonensis*, 77 (85%) *spots* para *L. braziliensis*, e 70 (71%) para *L. infantum*.

Em relação aos *spots* selecionados é possível fazer a seguinte observação: houve compartilhamento de *spots* com diferença de intensidade entre uma espécie e as outras duas, assim, do total de 1154 *spots* de *L. amazonensis*, 105 (9,1%) apresentaram intensidade aumentada em relação a *L. braziliensis* e 98 (8,5%) em relação a *L. infantum*. Em *L. braziliensis*, do total de 1095, 83 (7,6%) *spots* são mais intensos em relação a *L. amazonensis* e 61 (5,6%) em relação a *L. infantum*. Já em *L. infantum* 85 (7,0%) *spots* estavam mais intensos em relação a *L. amazonensis* e 68 (5,6%) em relação a *L. braziliensis* do total de 1216. Uma visão representativa da porcentagem de *spots* diferencialmente intensos entre as espécies de *Leishmania* estudadas pode ser observada na Figura 9.

Os *spots* mais intensos em *L. amazonensis* em relação a *L. braziliensis* e/ou *L. infantum* estão destacados na Figura 10, em *L. braziliensis* os *spots* com aumento de intensidade em relação a *L. amazonensis* e/ou *L. infantum* estão marcados na Figura 11. E na figura 12 estão selecionados os *spots* mais intensos em *L. infantum*, em relação a *L. amazonensis* e/ou *L. braziliensis*. Nessas figuras pode-se observar *spots* que foram selecionados como mais abundantes em uma espécie em relação as outras duas. Nas figuras 10, 11 e 12 mostramos também os géis marcados com os fluoróforos (Cy3 e Cy5), nos quais o extrato de uma mesma espécie apresentou inversão da marcação.

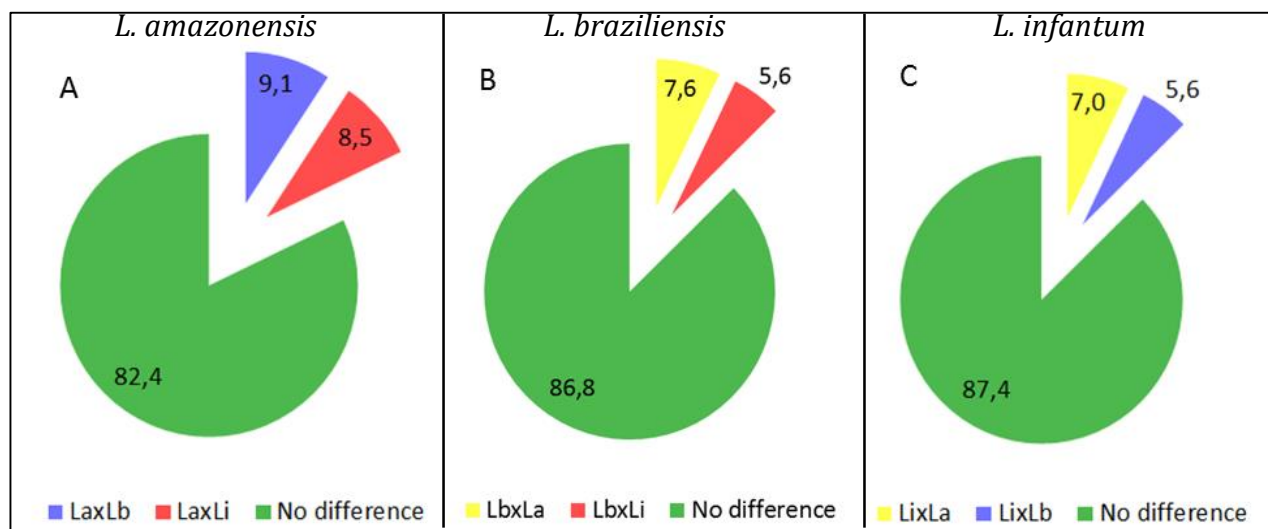


Figura 9: Representação gráfica da porcentagem de *spots* mais intensos em *L. amazonensis* (A), *L. braziliensis* (B) e *L. infantum* (C): Em A, a porcentagem dos *spots* sem diferença de intensidade (verde), *spots* mais intensos em *L. amazonensis* em relação a *L. braziliensis* (azul) e em relação a *L. infantum* (vermelho). Em B, a porcentagem dos *spots* sem diferença de intensidade (verde), *spots* mais intensos em *L. braziliensis* em relação a *L. amazonensis* (amarelo) e em relação a *L. infantum* (vermelho). Em C, a porcentagem dos *spots* sem diferença de intensidade (verde), *spots* mais intensos em *L. infantum* em relação a *L. amazonensis* (amarelo) e em relação a *L. braziliensis* (azul).

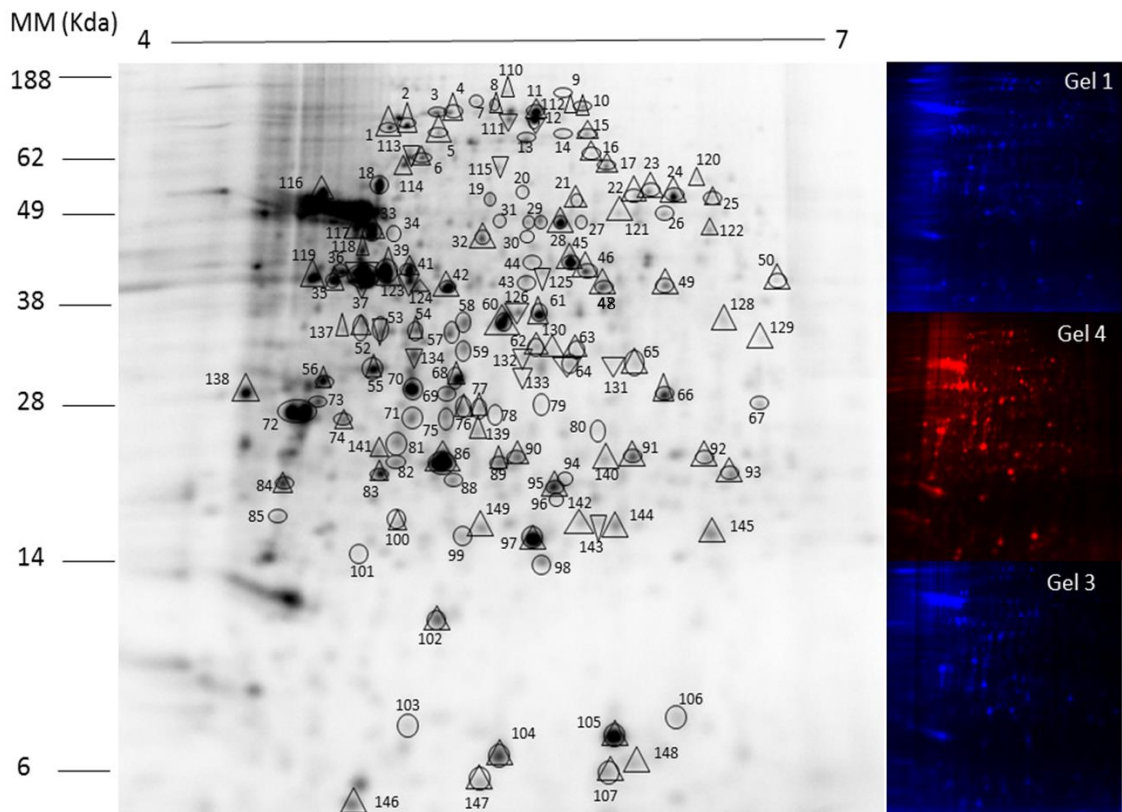


Figura 10: Spots mais intensos em *L. amazonensis*: Géis 2DE de 18 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, marcados com os Dyes. A figura mostra a seleção dos spots mais intensos em *L. amazonensis*, em relação a *L. braziliensis* (círculo) e *L. infantum* (triângulo). A numeração dos spots corresponde a identificação na Tabela suplementar. Os géis menores, na lateral direita, representam o extrato de *L. amazonensis* com inversão da marcação pelos fluoróforos, Cy3 (azul) e Cy5 (vermelho).

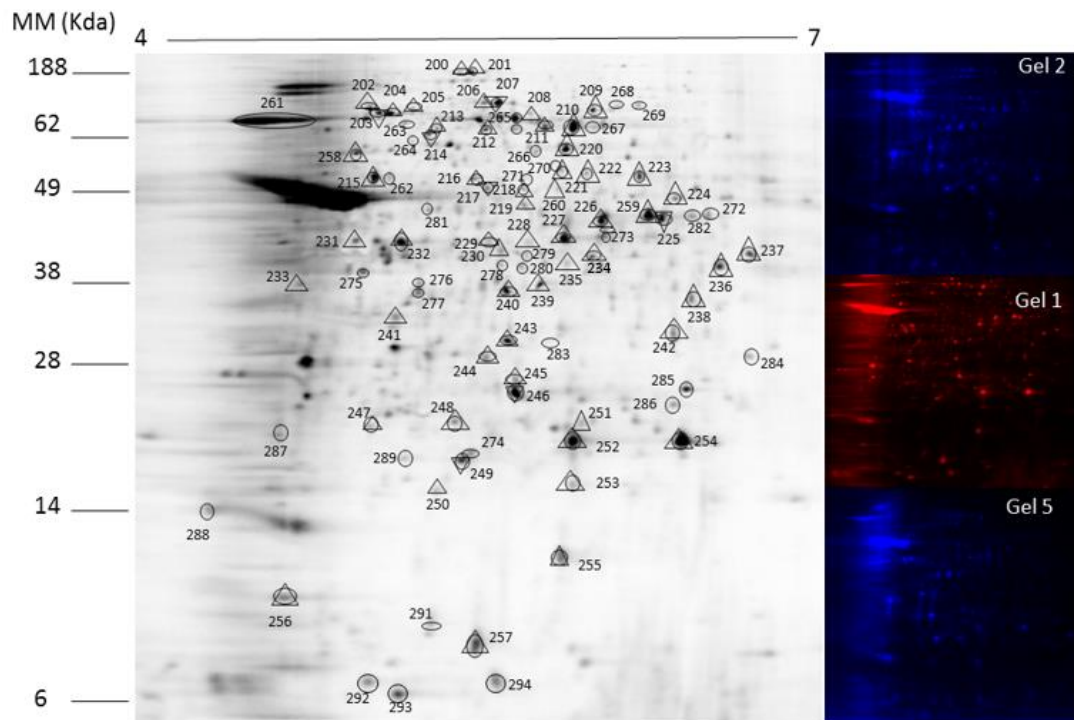


Figura 11: Spots mais intensos em *L. braziliensis*: Géis 2DE de 18 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, marcados com os Dyes. A figura mostra a seleção dos spots mais intensos em *L. braziliensis* em relação a *L. amazonensis* (círculo) e *L. infantum* (triângulo). A numeração dos spots corresponde a identificação na Tabela suplementar. Os géis menores, na lateral direita, representam o extrato de *L. braziliensis* com inversão da marcação pelos fluoróforos, Cy3 (azul) e Cy5 (vermelho).

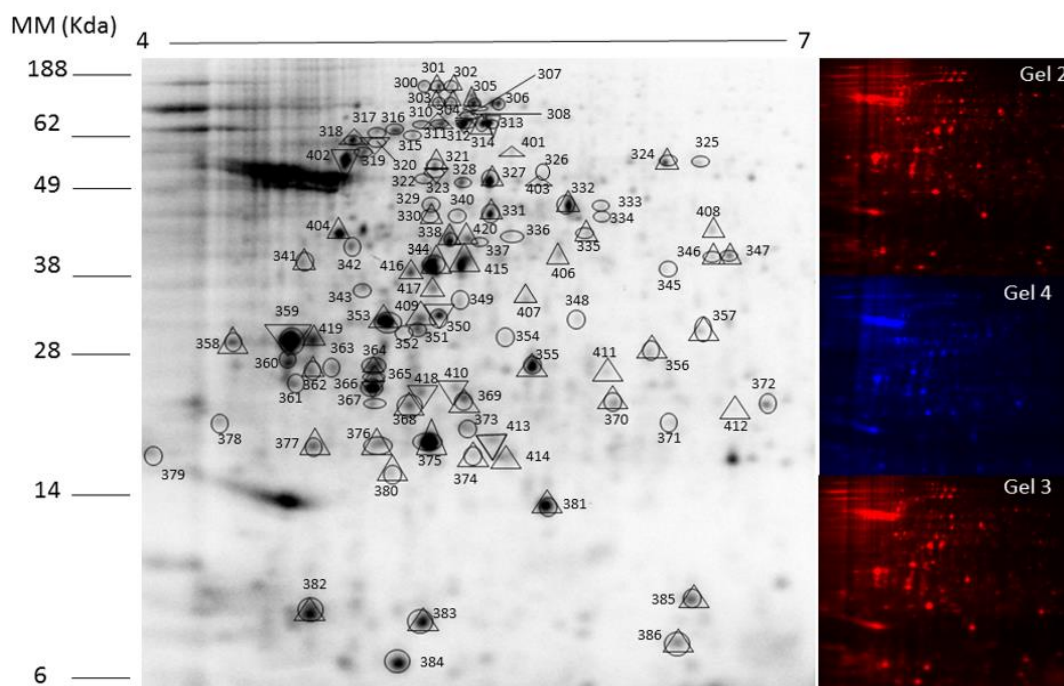


Figura 12: Spots mais intensos em *L. infantum*: Géis 2DE de 18 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, marcados com os Dyes. A figura mostra a seleção dos spots mais intensos em *L. infantum*, em relação a *L. amazonensis* (círculo) e *L. braziliensis* (triângulo). A numeração dos spots corresponde a identificação na Tabela suplementar. Os géis menores, na lateral direita, representam o extrato de *L. infantum* com inversão da marcação pelos fluoróforos, Cy3(azul) e Cy5(vermelho).

7.3 Identificação das Proteínas

Os 321 spots recuperados dos géis foram submetidos à espectrometria de massas e 260 foram identificados. Esses 260 spots equivalem a 223 proteínas, sendo 84 mais abundantes em *L. amazonensis*, 71 mais abundantes em *L. braziliensis* e 68 mais abundantes em *L. infantum*. Entretanto, quando analisamos os dados das três espécies em conjunto, é possível observar uma redundância das proteínas, sendo 52 delas observadas nas três, ou ao menos, em duas das espécies avaliadas. Assim, totalizaram 171 proteínas não redundantes, com diferença de abundância em alguma das espécies em relação às outras (Tabela Suplementar).

7.4 Heatmap

Inicialmente, foi calculado o *fold change* das proteínas com diferença de abundância. Para isso, foram comparados os valores entre duas espécies de *Leishmania* e normalizados em relação a terceira espécie, nomeada denominador. A partir daí, foram obtidos o *Z score* o qual permite comparar duas colunas diferentes e normalizar os dados com base na distribuição dos *fold change*. O *Z score* leva em conta a média dos *fold change* e o desvio padrão. Essas análises consideram, assim, o *fold change* de cada proteína nas espécies de comparação em relação a espécie ausente. Para visualizar a diferença global dos níveis de proteínas entre as diferentes espécies de *Leishmania*, *heatmaps* foram construídos (Figura 13).

Analisando a Figura 13, foi possível observar uma grande variação das proteínas com diferença nos níveis de abundância, entre as espécies estudadas. Os *heatmaps* evidenciaram as diferenças de abundância de proteínas entre *L. braziliensis* e *L. infatum* (figura 13 A), entre *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (figura 13 B), e, por fim, entre *L. amazonensis* e *L. infatum* (figura 13 C).

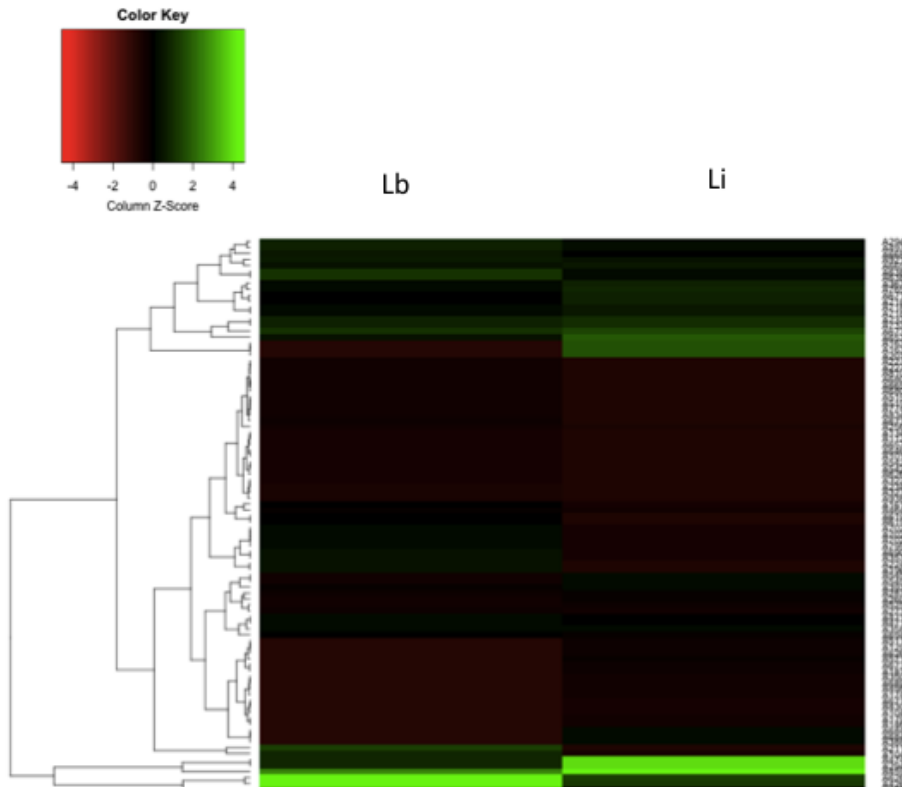


Figura 13 A: *Heatmap* das proteínas com níveis de abundância diferentes entre *L. braziliensis* (Lb) e *L. infatum* (Li), usando o *fold change* de *L. amazonensis*, como denominador.

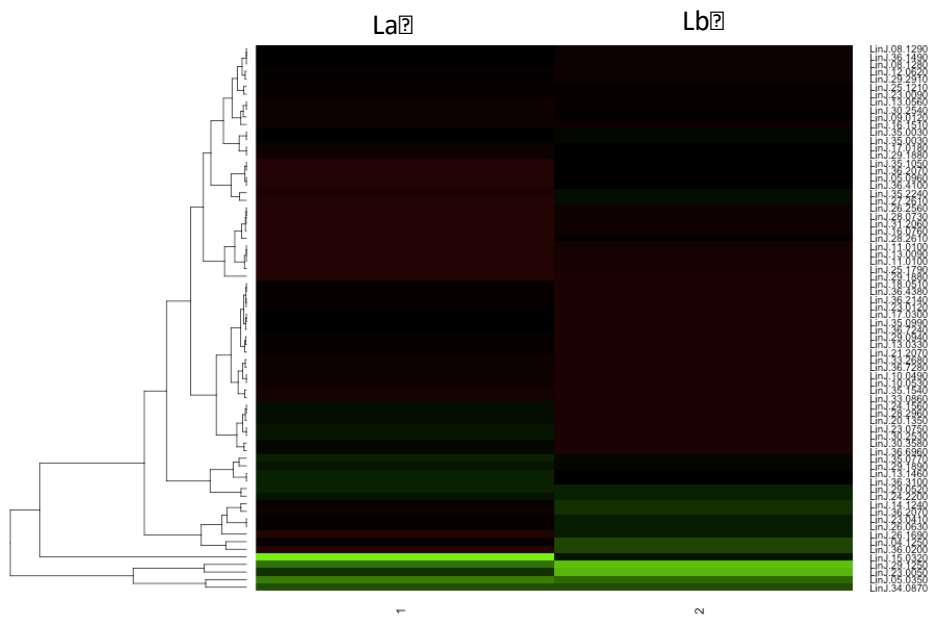


Figura 13 B: *Heatmap* das proteínas com níveis de abundância diferentes entre *L. amazonensis* (La) e *L. braziliensis* (Lb), usando o *fold change* de *L. infatum*, como denominador.

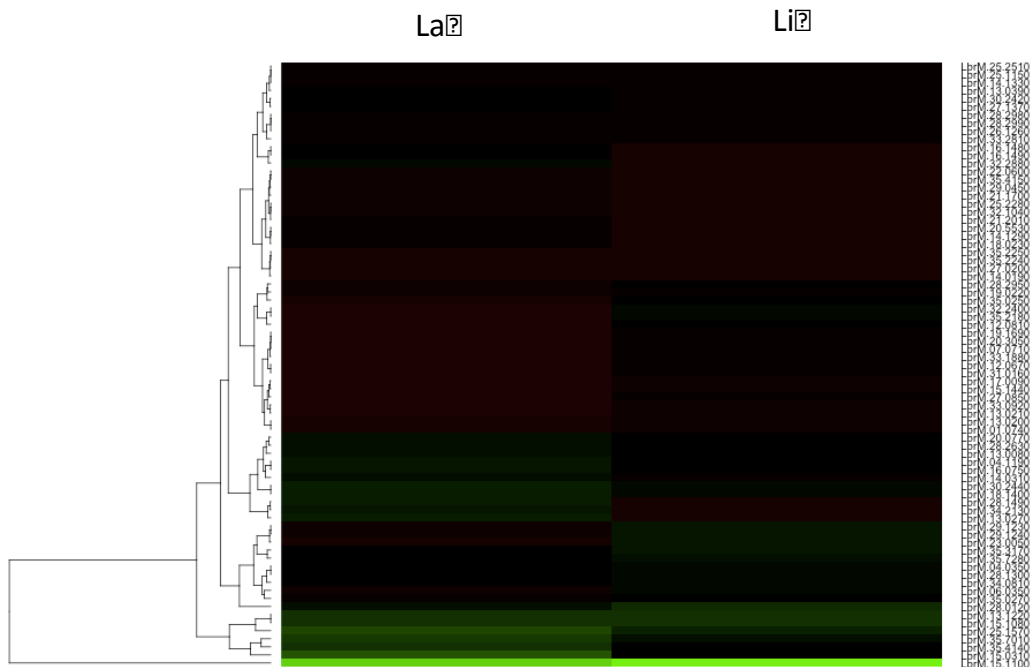


Figura 13 C: *Heatmap* das proteínas com níveis de abundância diferentes entre *L. amazonensis*(La) e *L. infatum* (Li), usando o *fold change* de *L. braziliensis*, como denominador.

Pela análise de componente principal (PCA), que representa a diferença global das proteínas nas amostras, podemos observar que *L. amazonensis* e *L. infatum* estão mais próximas, e ambas mais distantes de *L. braziliensis*; e que a primeira ocupa posição central entre as outras duas espécies. Isso poderia ser explicado pelo fato de *L. amazonensis* causar, frequentemente, a forma cutânea da doença, assim como *L. braziliensis*, mas pertencer ao subgênero *Leishmania*, como *L. infatum*. Além disso, alguns estudos revelaram o potencial visceralizante da *L. amazonensis* (Figura 14).

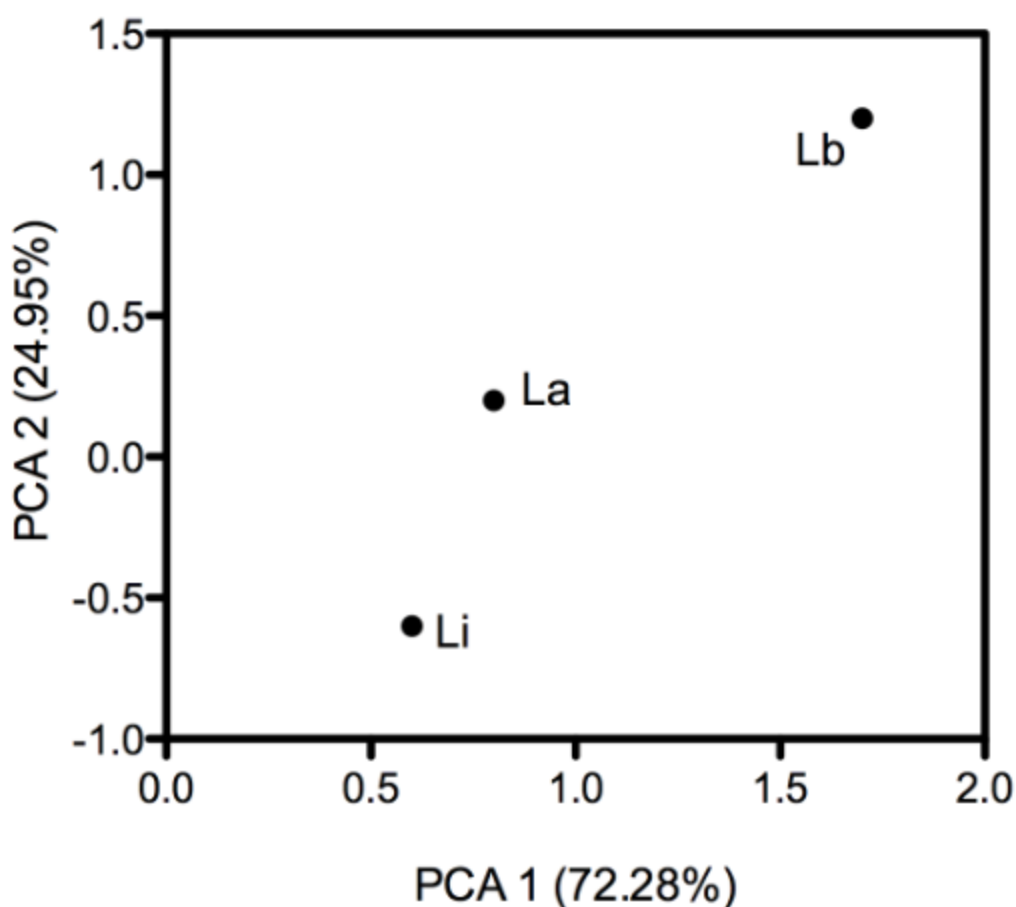


Figura 14: Análise de componente principal (PCA): Análise de PCA mostrando a aproximação de *L. infatum* e *L. amazonensis*, e o afastamento da primeira em relação a *L. braziliensis*. As análises consideraram o número e o nível das proteínas com diferença de abundância entre as espécies. Os componentes 1 e 2 representam, juntos, 97,23% da variância dos dados.

7.5 Redes biológicas moleculares

Para avaliar quais processos biológicos podem estar associados a essas proteínas, diferencialmente presentes entre as espécies, foram construídas redes de predição de interação proteína - proteína. As redes também foram construídas, porque somente avaliação da anotação das proteínas diferencialmente presentes não é suficiente para identificar potenciais processos biológicos associados com variações espécie específica. A anotação não indica claramente todas as vias metabólicas e de sinalização que uma proteína pode participar.

A predição de redes de interação entre as proteínas mais abundantes em *L. amazonensis* (Figura 15 A), *L. braziliensis* (Figura 15 B) e *L. infantum* (Figura 15 C) demonstraram que muitas dessas proteínas interagem entre si. Esse elevado número de proteínas com aumento de abundância pode indicar direcionamento para favorecer alguns processos. As redes de interação proteína-proteína foram baseadas em dados depositados no String. Estas redes de interação representam um subconjunto enriquecido de proteínas diferencialmente abundantes de redes de espécies de *Leishmania* previamente construídas com dados da literatura e predição disponíveis no String. Cada círculo representa uma proteína, e a possibilidade de interações físicas entre duas proteínas é representada por uma aresta que liga dois círculos. Quando um círculo, coincide com uma proteína diferencialmente abundante, ele é preenchido com a cor preta.

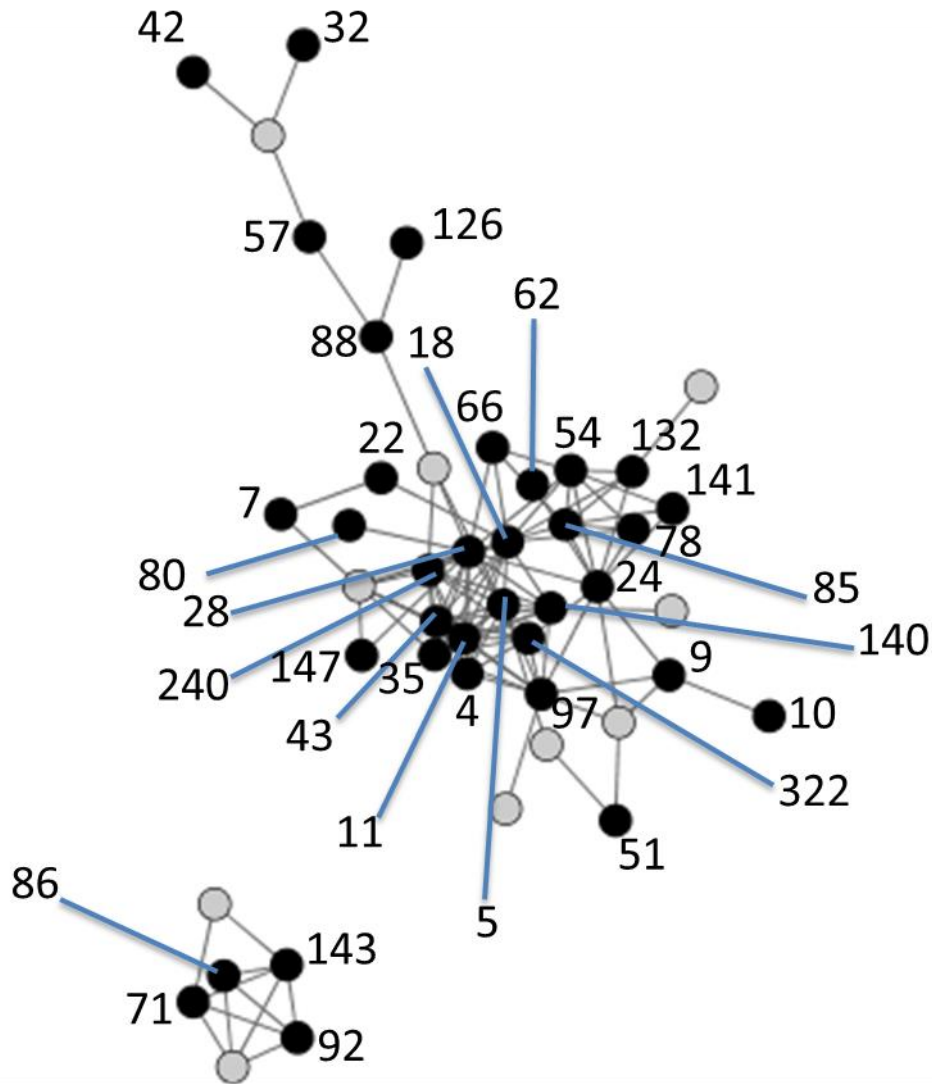


Figura 15 A: Rede de predição de interação proteína- proteína de *L. amazonensis*. Os números dos nós representam as proteínas descritas na tabela suplementar. Os círculos pretos representam proteínas com diferença de abundância, entre as espécies. Os círculos em cinza representam proteínas que não foram observadas com diferença de abundância, mas participam dos mesmos processos biológicos.

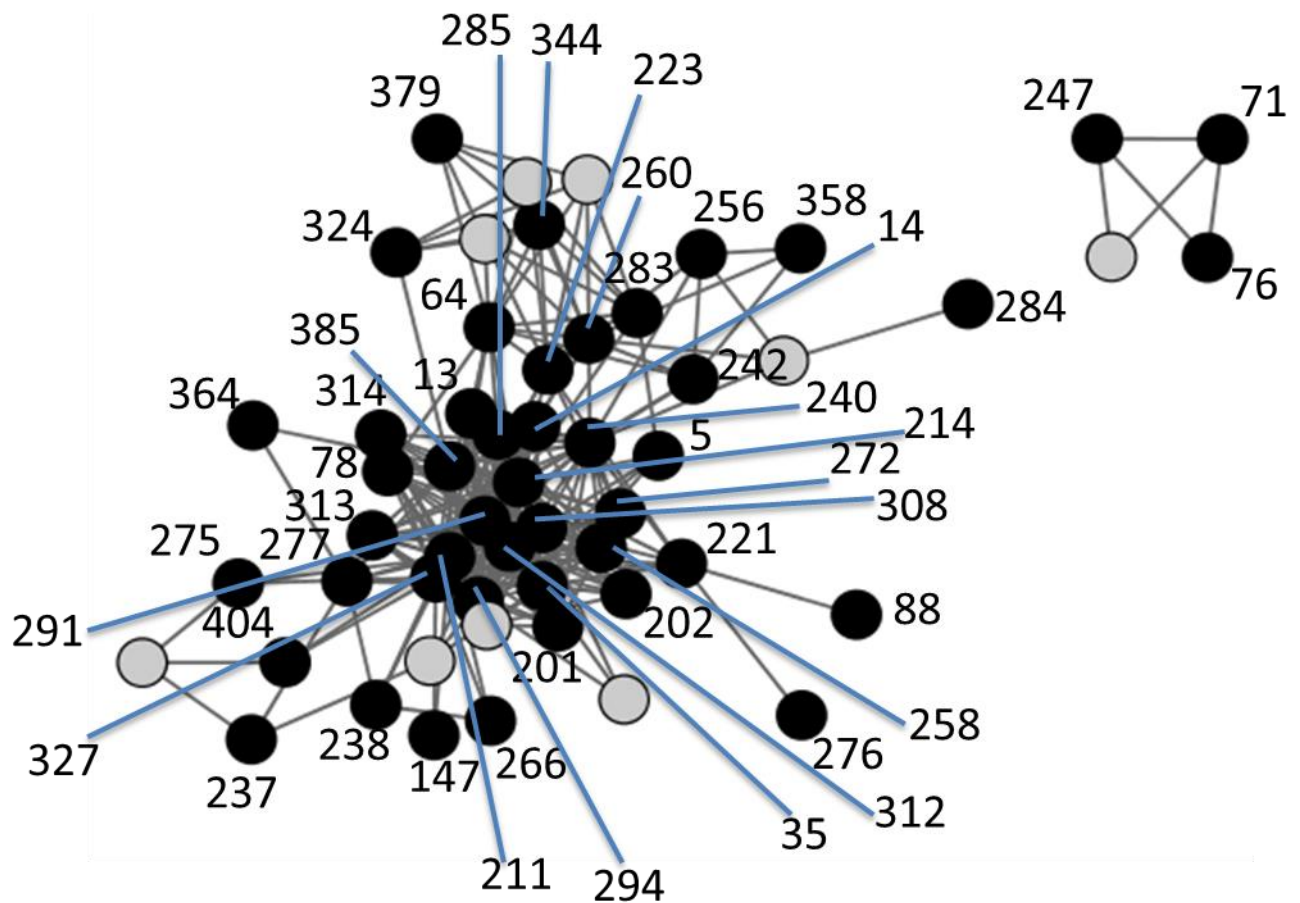


Figura 15 B: Rede de predição de interação proteína- proteína de *L. braziliensis*. Os números dos nós representam as proteínas descritas na tabela suplementar. Os círculos pretos representam proteínas com diferença de abundância, entre as espécies. Os círculos em cinza representam proteínas que não foram observadas com diferença de abundância, mas participam dos mesmos processos biológicos.

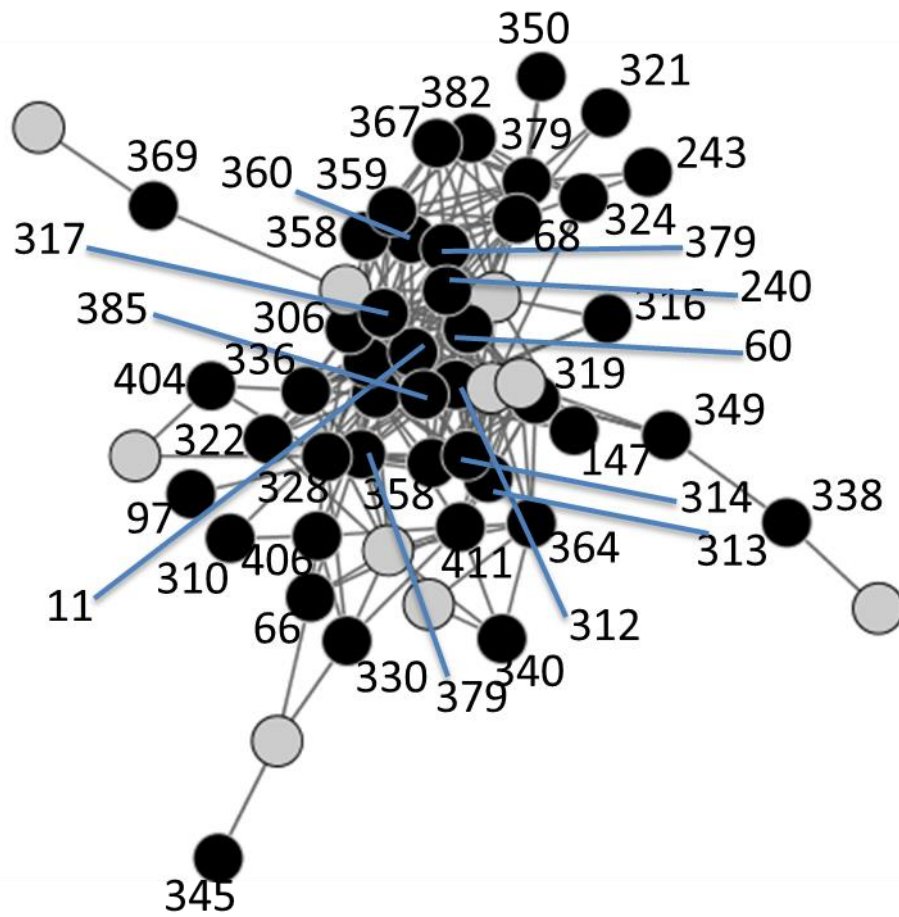


Figura 15 C: Rede de predição de interação proteína- proteína de *L. infatum*. Os números dos nós representam as proteínas descritas na tabela suplementar. Os círculos pretos representam proteínas com diferença de abundância, entre as espécies. Os círculos em cinza representam proteínas que não foram observadas com diferença de abundância, mas participam dos mesmos processos biológicos.

7.6 Categorização das proteínas

Destacamos 6 categorias funcionais enriquecidas nas espécies estudadas: metabolismo do nitrogênio, resposta ao stress, organização do citoesqueleto, transporte, desenvolvimento de estruturas e vias associadas a regulação do sistema imune; sendo que, nessa última, o enriquecimento estava presente, em *L. braziliensis* e *L. infatum* (Figura 16). Na tabela 3 estão listadas as proteínas diferencialmente abundantes associadas com processos biológicos enriquecidos. Podemos observar, que *L. infatum*, espécie com maior potencial de visceralização, apresentou maior quantidade de proteínas detectadas para quase todos os processos, sugerindo que essa maior abundância de proteínas pode estar associada com a infecção de órgãos como fígado e baço e sobrevivência no interior do corpo do hospedeiro.

Na categoria metabolismo do nitrogênio *L. amazonensis* apresentou maior número de proteínas associadas a esse processo biológico enriquecido, incluindo a arginase.

Em resposta ao *stress* podemos destacar o aumento significativo do número de proteínas associadas a esse processo biológico enriquecido em *L. infatum*, e o papel fundamental das proteínas: gp 63 e da HSP 70. A primeira aumentada apenas em *L. infatum* e a segunda com maior número de interações preditas com proteínas diferencialmente abundantes em *L. infatum* do que em *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

Na categoria sistema imune também observamos um número maior número de proteínas associadas ao processo biológico enriquecido em *L. infatum*, em relação a *L. braziliensis*, considerando que esse processo não apresentou enriquecimento para *L. amazonensis*. Essa diferença pode elucidar o comportamento nos ambientes visceral e tegumentar, respectivamente. Nesse processo biológico, podemos ressaltar a gp 63, proteína com aumento de abundância apenas em *L. infatum*.

Na categoria transporte observamos, também, um maior número de proteínas associadas a esse processo enriquecido em *L. infatum*. Nessa classe funcional, podemos salientar a ATPase, proteína que também apresentou maior número de interações preditas, com proteínas diferencialmente abundantes, em *L. infatum* do que em *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

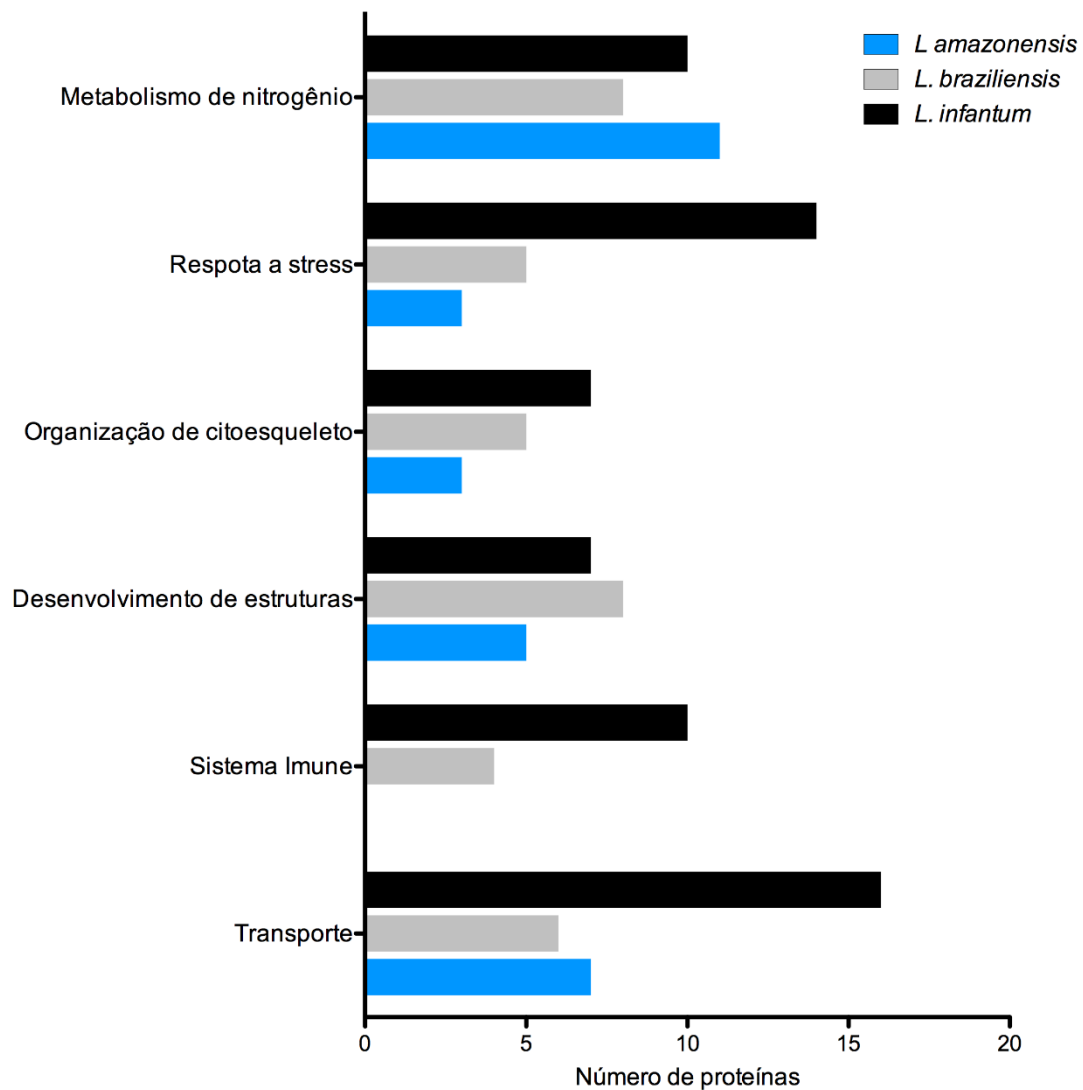


Figura 16: Análise dos processos biológicos enriquecidos: Categorização funcional das proteínas de *Leishmania infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* realizada no programa Cytoscape, utilizando os dados de abundância diferencial entre as três espécies. As categorias funcionais utilizadas foram descritas a partir do genoma de cada uma das espécies.

Tabela 3: Categorização funcional das proteínas identificadas segundo análise no Gene Ontology (GO)

<i>Categoria funcional</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. infantum</i>
<i>Metabolismo de nitrogênio</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1.actin 2. arginase 3. enolase 4. mannose-1-phosphate Guanyltransferase 5. mercaptopyruvate Sulfurtransferase 6. putative ATPase beta Subunit 7. putative seryl-tRNA Synthetase 8. putative spermidine Synthase 9. putative ubiquitin-Conjugating enzyme e2 10. putative vacuolar ATP synthase subunit b 11. UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase 2 	<ol style="list-style-type: none"> 1.actin 2. elongation factor 1-alpha 3. enolase 4. putative ATPase beta subunit 5. putative eukaryotic initiation factor 4a 6. putative seryl-tRNA synthetase 7. putative vacuolar ATP synthase subunit B 8. S-adenosylhomocysteine Hydrolase 	<ol style="list-style-type: none"> 1. putative seryl-tRNA synthetase 2 putative ATPase beta subunit 3 Actin 4 elongation factor 1-alpha 5. S-adenosylhomocysteine hydrolase 6. putative vacuolar ATP synthase subunit b 7. enolase 8. GDP-mannose pyrophosphorylase 9. putative ATPase beta subunit 10. putative ATPase beta subunit
<i>Resposta ao stress</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1.actin 2.HSP-70 3.putative ubiquitin-conjugating enzyme e2 	<ol style="list-style-type: none"> 1. actin 2. Hsp-70 3. putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor 4. putative small GTP-binding protein Rab1 5. S-adenosylhomocysteine hydrolase 	<ol style="list-style-type: none"> 1. actin 2. beta tubulin 3. beta tubulin 4. beta tubulin 5. beta tubulin 6. GP63, leishmanolysin 7. GP63, leishmanolysin 8. GP63, leishmanolysin 9. GP63, leishmanolysin 10. GP63, leishmanolysin 11. putative heat-shock protein hsp70 12. putative heat-shock protein hsp70 13. putative heat-shock protein hsp70 14. S-adenosylhomocysteine hydrolase
<i>Organização do citoesqueleto</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1.actin 2.alpha tubulin 3.putative vacuolar ATP synthase subunit b 	<ol style="list-style-type: none"> 1.actin 2.alpha tubulin 3.alpha tubulin 4.beta-tubulin 5.putative vacuolar ATP synthase subunit B 	<ol style="list-style-type: none"> 1.actin 2.alpha tubulin 3.beta-tubulin 4.beta-tubulin 5.beta-tubulin 6.beta-tubulin 7.putative vacuolar ATP synthase subunit B

Desenvolvimento de estruturas	<ol style="list-style-type: none"> 1.actin 2.alpha tubulin 3.Hsp-70 4.putative serine/threonine protein phosphatase catalytic subunit 5.putative ubiquitin-conjugating enzyme e2 	<ol style="list-style-type: none"> 1.actin 2.alpha tubulin 3.alpha tubulin 4.alpha tubulin 5.elongation factor 1-alpha 6.Hsp-70 7.putative heat shock 70-related protein 1 8.putative small GTP-binding protein Rab1 	<ol style="list-style-type: none"> 1.actin 2.alpha tubulin 3.putative heat-shock protein hsp70 4.putative heat-shock protein hsp70 5.putative heat-shock protein hsp70 6.putative serine/threonine
Sistema Imune		<ol style="list-style-type: none"> 1.HSP-70 2.putative heat shock 70-related protein 1 3.S-adenosylhomocysteine hydrolase 4.S-adenosylhomocysteine hydrolase 	<ol style="list-style-type: none"> 1.beta tubulin 2.beta tubulin 3.beta tubulin 4.beta tubulin 5.GP63, leishmanolysin 6.GP63, leishmanolysin 7.GP63, leishmanolysin 8.GP63, leishmanolysin 9.GP63, leishmanolysin 10.S-adenosylhomocysteine hydrolase
Transporte	<ol style="list-style-type: none"> 1.actin 2. alpha tubulin 3. cytochrome c oxidase subunit IV 4.HSP-70 5.putative ATPase beta subunit 6.putative serine/threonine protein phosphatase catalytic subunit 7.putative vacuolar ATP synthase subunit b 	<ol style="list-style-type: none"> 1. actin 2. cytochrome c oxidase subunit IV 3.putative ATPase beta subunit 4.putative heat shock 70-related protein 1 5.putative small GTP-binding protein Rab1 6. putative vacuolar ATP synthase subunit B 	<ol style="list-style-type: none"> 1. actin 2. cytochrome c oxidase subunit IV 3.GP63, leishmanolysin 4.GP63, leishmanolysin 5.GP63, leishmanolysin 6.GP63, leishmanolysin 7.GP63, leishmanolysin 8.putative ATPase beta subunit 9. putative ATPase beta subunit 10. putative ATPase beta subunit 11. putative heat-shock protein hsp70 12. putative heat-shock protein hsp70 13. putative heat-shock protein hsp70 14. putative serine/threonine 15.putative vacuolar ATP synthase subunit b 16. S-adenosylhomocysteine hydrolase

7.7 Seleção das proteínas antigênicas

Primeiramente, foi realizada a padronização dos experimentos de WB, e a definição dos parâmetros de diluição dos *pools* de soro dos pacientes com as diferentes formas clínicas e dos indivíduos controle, do anticorpo conjugado, bem como o tempo de exposição da membrana à quimioluminescência, para os extratos de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Posteriormente foi avaliada e confirmada a reprodutibilidade da técnica.

Assim, foi realizada a seleção dos antígenos a partir das membranas contendo extrato protéico de cada espécie (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*) reveladas com *pool* de soro de pacientes diagnosticados com LT e LV e com o *pool* de soros de indivíduos saudáveis (Figuras 17, 18 e 19). Em seguida as membranas foram analisadas no programa *Image Master 2D Platinum 6.0* (GE Healthcare). Para os extratos protéicos de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, os *spots* reativos aos *pools* dos soros controle e dos pacientes diagnosticados com LV foram excluídos das análises. De forma semelhante, a avaliação do extrato de *L. infantum* excluiu das análises os *spots* reconhecidos pelo *pool* dos soros controle.

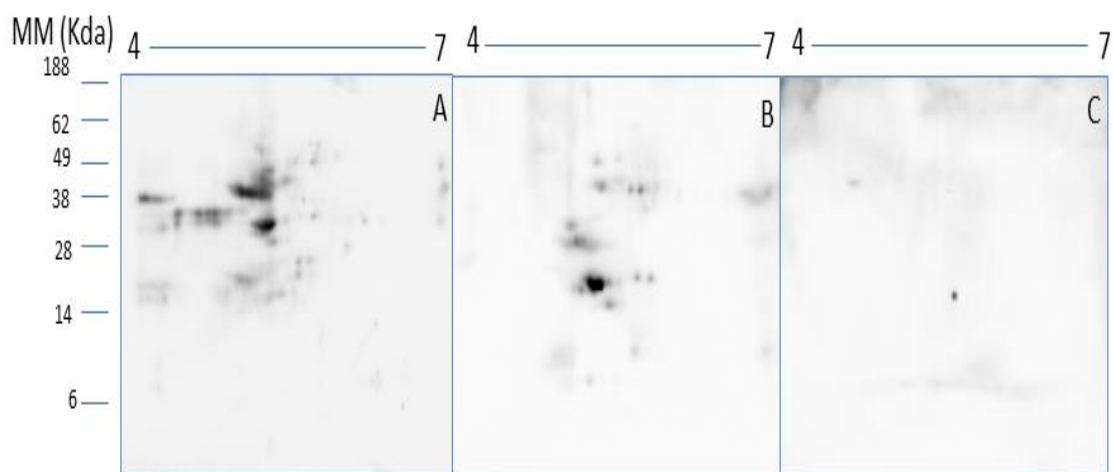


Figura 17: Western blot de *L. amazonensis*. Membranas obtidas a partir de gel 2D, após fracionamento de 200ug do extrato proteico de *L. amazonensis* em tiras de 7cm, PH 4-7. A) Membrana incubada com *pool* de soros de pacientes com LT (1:160) .B) Membrana incubada com *pool* de soros de pacientes com LV (1:640) C) Membrana incubada com *pool* de soros de indivíduos saudáveis (1:160). Diluição do anticorpo secundário anti-humano conjugado com peroxidase foi de 1:100.000.

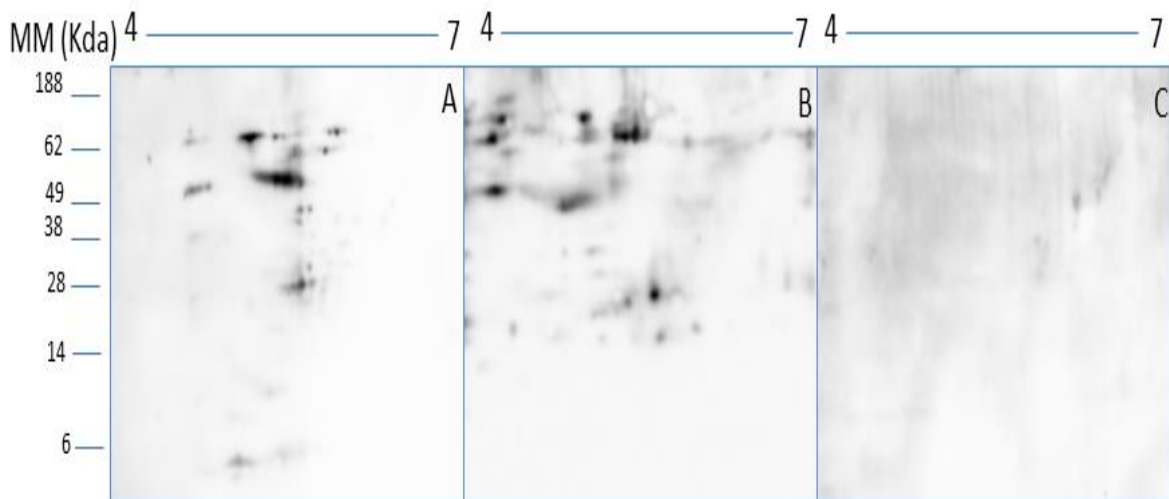


Figura 18: Western blot de *L. braziliensis*. Membranas obtidas a partir de gel 2D, após fracionamento de 200ug do extrato protéico de *L. braziliensis* em tiras de 7cm, PH 4-7. A) Membrana incubada com *pool* de soros de pacientes com LT (1:160). B) Membrana incubada com *pool* de soros de pacientes com LV (1:640). C) Membrana incubada com *pool* de soros de indivíduos saudáveis (1:160). Diluição do anticorpo secundário anti-humano conjugado com peroxidase foi de 1:100.000.

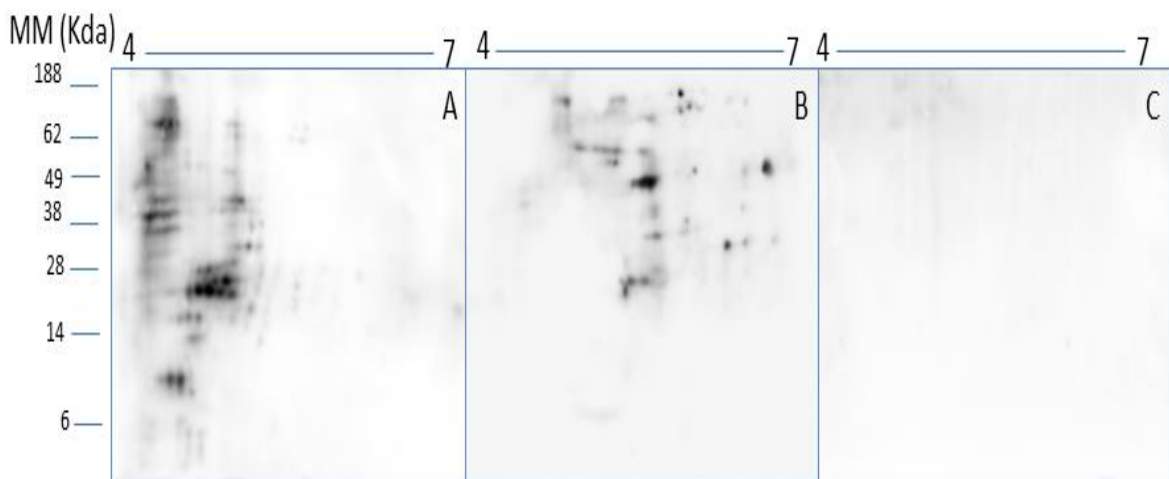


Figura 19: Western blot de *L. infantum*. Membranas obtidas a partir de gel 2D, após fracionamento 200 ug do extrato protéico de *L. infantum* em tiras de 7cm, PH 4-7. A) Membrana incubada com *pool* de soros de pacientes com LV (1:640). B) Membrana incubada com *pool* de soros de pacientes com LT (1:160). C) Membrana incubada com *pool* de soros de indivíduos saudáveis (1:160). Diluição do anticorpo secundário anti-humano conjugado com peroxidase foi de 1:100.000.

7.8 Sobreposição dos spots antigênicos e diferencialmente intensos

Nas figuras 20, 21 e 22 estão representados os *spots* diferencialmente intensos e antigênicos identificados nos géis e membranas com antígenos de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, respectivamente. Os *spots* selecionados e que estão devidamente identificados são aqueles que mostraram reatividade exclusiva aos antígenos de *L. amazonensis* e de *L. braziliensis* com o *pool* de soros de paciente com LT. Os *spots* selecionados no extrato de *L. infantum* que mostraram reatividade exclusiva ao *pool* de soros de pacientes diagnosticados com LV ou LT também foram identificados.

Em *L. amazonensis* foram selecionados 139 *spots* com intensidade aumentada, em relação a *L. braziliensis* e/ou *L. infantum*, desses, 11 (7,5%) foram demonstrados como sendo imunogênicos exclusivos em relação ao *pool* de soros de pacientes diagnosticados com LT. Avaliando *L. braziliensis*, do total de 95 *spots* mais intensos nessa espécie em relação a *L. amazonensis* e/ou *L. infantum*, dois (2%) são imunogênicos, com reatividade exclusiva ao *pool* dos soros de pacientes com LT. Em relação a *L. infantum*, 104 *spots* apresentaram intensidade aumentada em relação a *L. amazonensis* e/ou *L. braziliensis*, dos quais 12 (11,4%) deles foram reativos exclusivamente ao *pool* dos soros de pacientes diagnosticados com LV. Para essa espécie, foram destacados ainda os *spots* mais intensos e que apresentaram reatividade exclusiva com o *pool* de soros dos pacientes diagnosticados com LT, representado por três *spots* (3%).

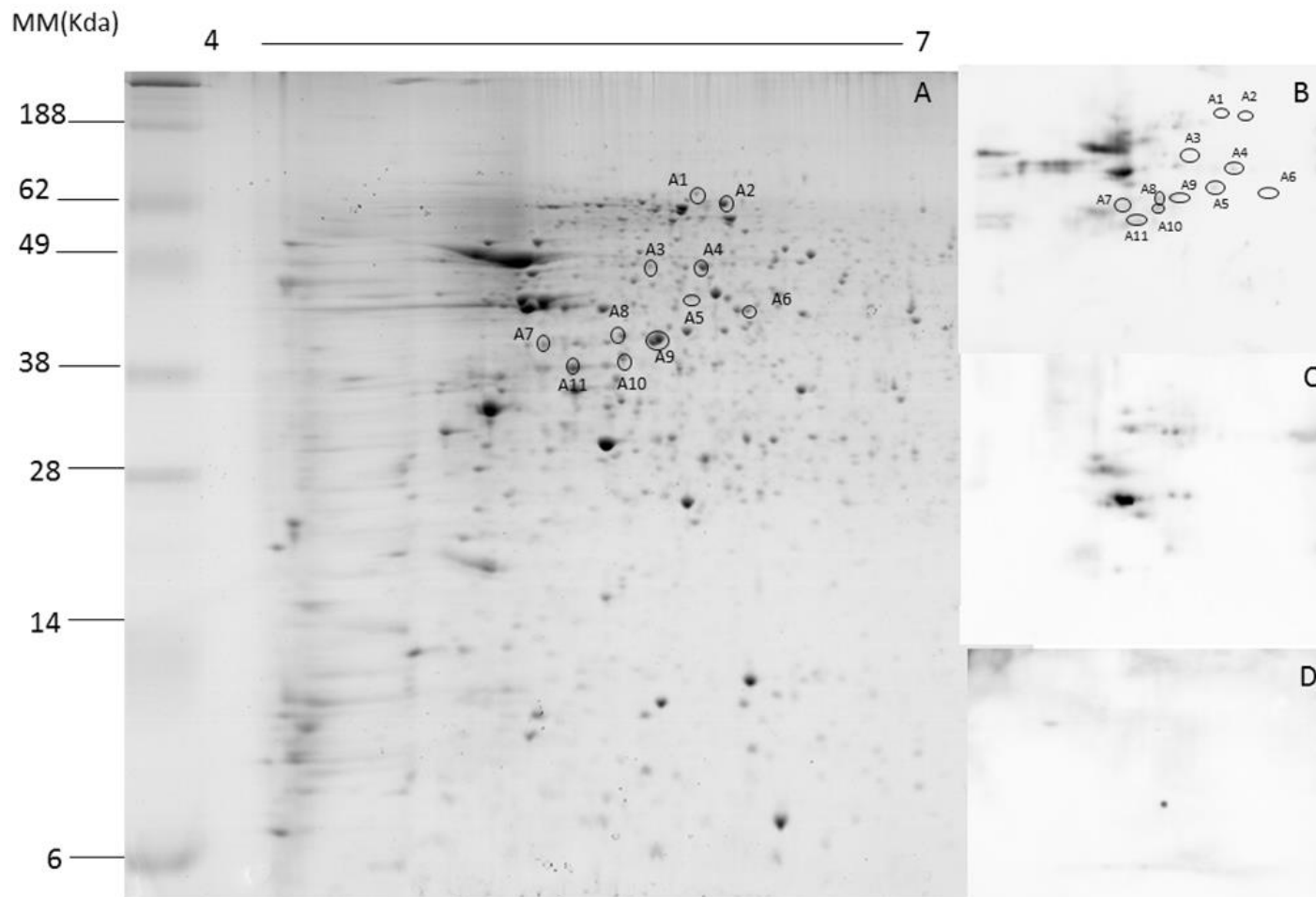


Figura 20: Seleção de spots imunogênicos e com abundância aumentada em *L. amazonensis*. (A) Extrato de promastigotas (900 µg) de *L. amazonensis* fracionado pelo 2-DE (SDS-PAGE 12%, strips IPG 18 cm, pH 4–7 e corados com Coomassie G-250), mostrando spots imunogênicos reativos somente com pool de soro de pacientes com LT, e com aumento na abundância (o). Membranas obtidas a partir de gel 2-DE (SDS-PAGE 12%, strips IPG 7 cm, pH 4–7) após fracionamento de 200 µg do extrato protéico de *L. amazonensis* e incubadas com pool de soros de pacientes com LT (1:160) (B), pool de soros de pacientes com LV (1:640) (C) e pool de soros de indivíduos saudáveis (1:160) (D). Anti-humano conjugado com HRP na diluição 1:100.000. Padrão de massa molecular (MW) está indicado em kDa.

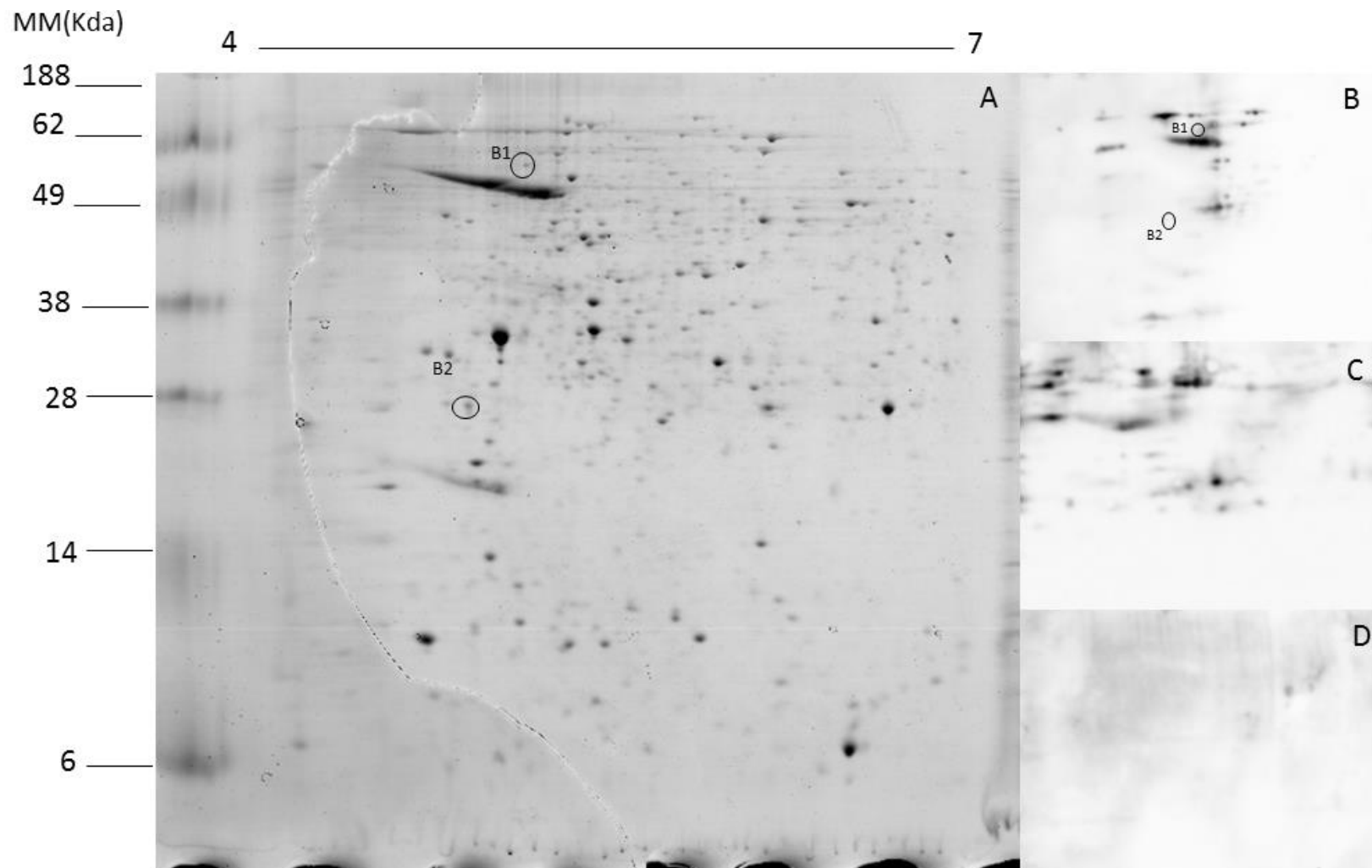


Figura 21: Seleção de spots imunogênicos e com abundância aumentada em *L. braziliensis*. (A) Extrato de promastigotas (900 µg) de *L. braziliensis* fracionado pelo 2-DE (SDS-PAGE 12%, strips IPG 18 cm, pH 4–7 e corados com Coomassie G-250), mostrando spots imunogênicos reativos somente com pool de soro de pacientes com LT, e com aumento na abundância (o). Membranas obtidas a partir de gel 2-DE (SDS-PAGE 12%, strips IPG 7 cm, pH 4–7) após fracionamento de 200 µg do extrato protéico de *L. braziliensis* e incubadas com pool de soros de pacientes com LT (1:160) (B), pool de soros de pacientes com LV (1:640) (C) e pool de soros de indivíduos saudáveis (1:160) (D). Anti-humano conjugado com HRP na diluição 1:100.000. Padrão de massa molecular (MW) está indicado em kDa.

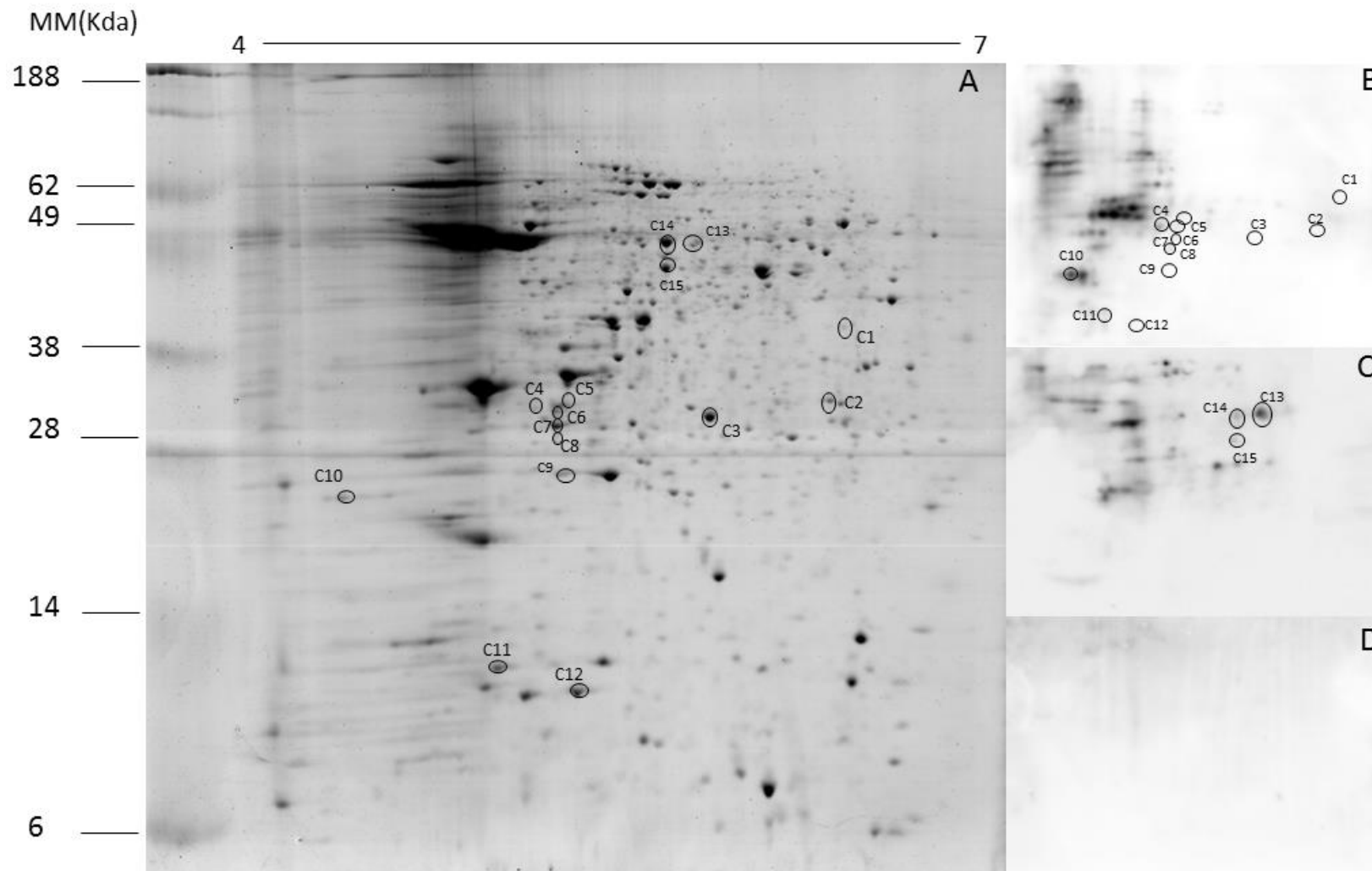


Figura 22: Seleção de spots imunogênicos e com abundância aumentada em *L. infantum*. (A) Extrato de promastigotas (900 µg) de *L. infantum* fracionado pelo 2-DE (SDS-PAGE 12%, strips IPG 18 cm, pH 4-7 e corados com Coomassie G-250), mostrando spots imunogênicos reativos somente com pool de soro de pacientes com LV (B) ou com pool de soros de pacientes com LT (C), e com aumento na abundância (o). Membranas obtidas a partir de gel 2-DE (SDS-PAGE 12%, strips IPG 7 cm, pH 4-7) após fracionamento de 200 µg do extrato protéico de *L. infantum* e incubadas com pool de soros de pacientes com LV (1:640) (B), pool de soros de pacientes com LT (1:160) (C) e pool de soros de indivíduos saudáveis (1:160) (D). Anti-humano conjugado com HRP na diluição 1:100.000. Padrão de peso molecular (MW) está indicado em kDa.

Em *L. amazonensis*, dos 11 spots selecionados como mais intensos e imunogênicos exclusivos para a forma LT, nove (82%) foram identificados, e correspondem a dez proteínas distintas. Avaliando *L. braziliensis*, os dois spots selecionados, como mais intensos e imunogênicos exclusivos para a forma LT foram identificados, correspondendo a duas proteínas. Em relação a *L. infantum*, dos 15 spots selecionados como mais intensos e imunogênicos, 12 reativos ao pool de soros da LV e três da LT, 12 (80%) foram devidamente identificados e equivalem a quatorze proteínas não redundantes. (Tabela 4).

Tabela 4 - Proteínas antigênicas e diferencialmente abundantes em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Spot*	Proteína	GI	Expressão/espécie		
			<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. infantum</i>
A1/9	putative trypanothione synthetase	gi 322493004	●●●	●	✕
A2/10	metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3	gi 322492700 gi 134070535 (só 1 peptídeo)	●●●	●	●
A4/28	Enolase alpha tubulin	gi 134068394 gi 606648	●●●	●	●
A5/30	elongation factor 2	gi 68129663 gi 322490597	●●●	●	✕
A7/53	peptidase m20/m25/m40 family-like protein, partial	gi 322493954	●●●	●	●
	conserved hypothetical protein heat shock protein 70	gi 322489647 gi 293057			
A8/58	alpha tubulin	gi 322489468	●●●	●	✕
A9/60	elongation factor 2	gi 68129663	●●●	●	●
	beta tubulin	gi 68128896			

A10/59	conserved hypothetical protein alpha tubulin	gi 134063939 gi 322489468	●●●	●	X
A11/134	beta tubulin	gi 68128896	●●●	X	●
B1/258	putative heat shock protein	gi 134061093	●	●●●	●
B2/287	conserved hypothetical protein	gi 134060328	●	●●●	X
C1/345	putative aconitase zeta-crystallin/NADPH-oxidoreductase-like protein	gi 134068962 gi 112383450	●	X	●●●
C2/356	conserved hypothetical protein	gi 134070112	●	●	●●●
C5/364	putative succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	gi 68129949	●	●	●●●
C7/366	alpha tubulin succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative putative succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	gi 322489468 gi 322490883 gi 68129949	●	●	●●●
C8/367	alpha tubulin	gi 322489468	●	X	●●●
C9/376	putative mitochondrial peroxiredoxin	gi 16751316	●	●	●●●
C10/379	beta tubulin putative IgE-dependent histamine-releasing factor putative heat-shock protein hsp70	gi 68128896 gi 68126733 gi 134063644	●	X	●●●

C11/382	alpha tubulin paraflagellar rod protein 1	gi 322489468 gi 51704749	●	●	●●●
C12/384	small myristoylated protein 1	gi 55714656	●	✕	●●●
C13/403	succinyl-diaminopimelate desuccinylase- like protein	gi 134071863	✕	●	●●●
C14/327	Enolase	gi 134068394	●	●	●●●
C15/331	Actin	gi 12311849	●	●	●●●

Legenda: ●●● mais abundante; ● menos abundante; ✕ ausente.

*Spots numerados de acordo com as membranas (M) e os géis (G).

Dessas proteínas, com diferença de abundância e imunogenicidade, seis são exclusivas em *L. amazonensis* (tripanotiona sintetase putativa, metalo-peptidase Clan MA(E) Família M3, fator de alongação 2, peptidase parcial m20/m25/m40 familia-like e duas proteínas hipotéticas (GI 322489647 e 134063939), duas em *L. braziliensis* (proteína do choque térmico putativa e uma proteína hipotética - GI 134060328) e 10 em *L. infatum* (aconitase putativa, cadeia beta de succinil-CoA ligase putativa[formadora de GPD], peroxiredoxina mitocondrial putativa, fator de liberação de histamina dependente de IgE putativa, proteína paraflagelar rod 1, proteína miristoilada pequena 1, proteína zeta-cristalina / NADPH-oxidoreductase-like, proteína succinil-diaminopimelato desuccinilase-like, actina e uma proteína hipotética - GI 134070112), totalizando 18 proteínas, representados na figura 23. Além dessas, outras quatro proteínas: alfa tubulina, beta tubulina, enolase e HSP-70, mostraram imunogenicidade em *L. amazonensis* e *L. infatum*, simultaneamente.

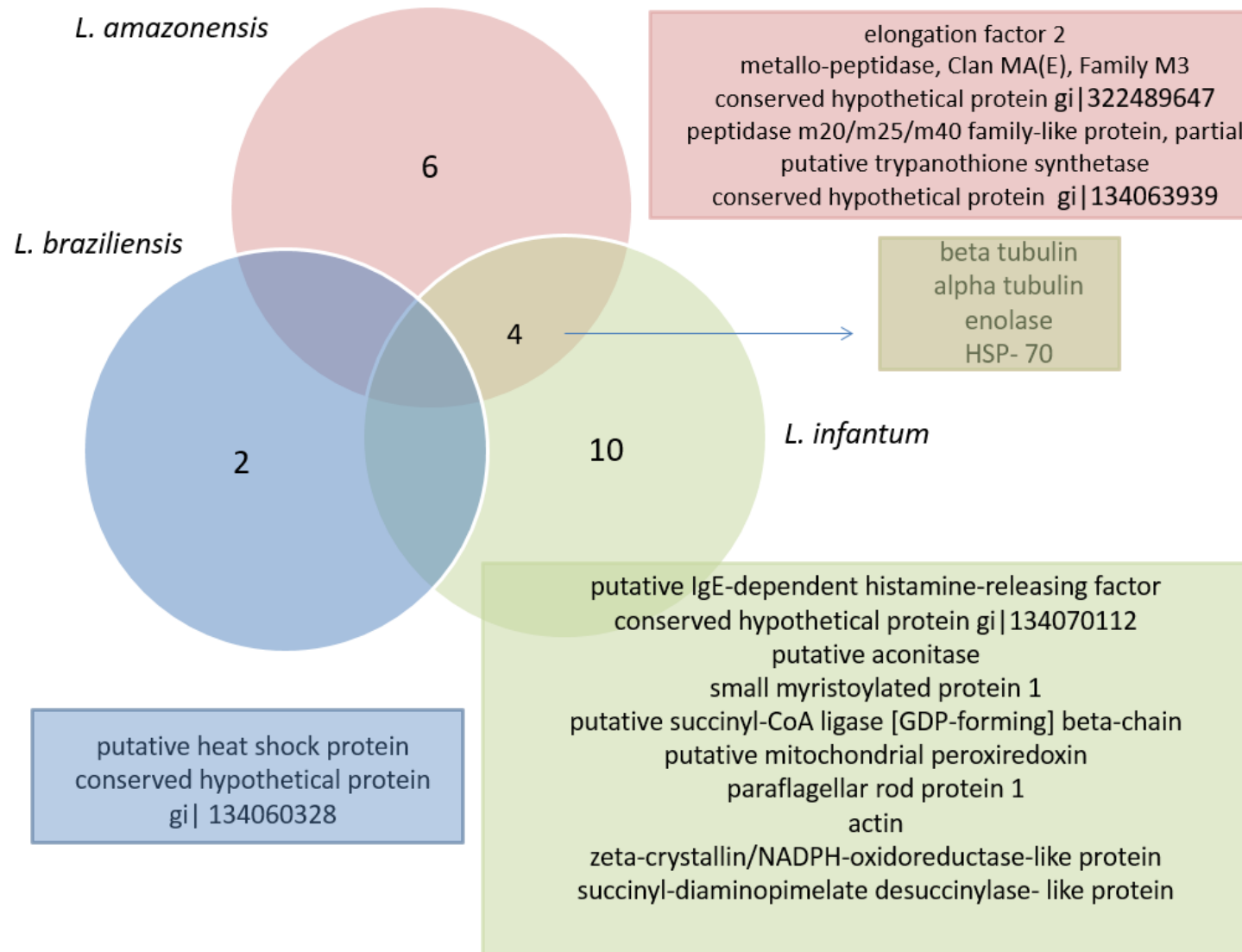


Figura 23: Diagrama de Venn: Representação das proteínas antigênicas e mais abundantes identificadas em cada uma das espécies.

7.9 Predição de epitopos

Considerando que a carência de testes sorológicos está muito mais relacionada a forma tegumentar, a predição de epitopos para células B, foi realizada nas proteínas que consideramos com maior potencial para antígeno no diagnóstico da LT. Assim, foram mapeadas todas as sequências de aminoácidos das proteínas mais abundantes e imunorreativas frente aos soros de pacientes com LT, em extratos das espécies causadoras dessa forma clínica (L.a e L.b). Foram selecionados somente os epitopos preditos, simultaneamente, nos dois softwares utilizados: ABCPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred>; Saha and Raghava, 2006) e BCPreds (<http://ailab.cs.iastate.edu/bcpreds/>; El-Manzalawy *et al.* 2008).

Considerando que soros de pacientes com doença de Chagas frequentemente reagem com os antígenos utilizados em testes sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose, foi realizado um BLASTp (Vexenat *et al.*, 1996), pesquisa feita contra GeneDB (<http://www.genedb.org/>) para avaliar as sequências de ortólogos em *T. cruzi* utilizando os epitopos selecionados anteriormente. A Tabela 5 mostra os 68 epitopos preditos para células B, das proteínas abundantes e imunorreativas para cada uma das espécies de *Leishmania*, e a taxa de similaridade com ortólogos em *T. cruzi*. As proteínas foram organizadas na tabela, considerando o percentual de epitopos em relação ao número total de aminoácidos.

Tabela 5: Proteínas identificadas pela imunoproteômica, seus epitopos preditos e o percentual de homologia desses com seus ortólogos em *T. cruzi*.

Spot*	Proteína Número de aminoácidos/% de epitopos	Epitopos Preditos	Homologia com <i>T. cruzi</i>
A5/A9	elongation factor 2 (845aa/14,43)	1-VSPVVRVAVEAKNP 2-FVKTLQNVNVVV 3-GAPLKISEPVVS 4-EDMPCGNVV 5-HRGGGQIPTARRV 6-CVEGVCVQTE 7-EAGDKRIMDTR 8-MGDVQVSPEKGTVA 9-LADNYEWDVQEAR 10-FGVDELKMRERLW	100% 92% 92% 89% 100% 100% 91% 93% 69% 85%
A2	metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 (685aa/ 14,14)	11-SHACCHSVPPV 12-VRDEATNRVVE 13-GIAPPNRTFQ 14-EIQEYFPMD 15-MAKKPEMAQ 16-PEEEFQKVVQLQ 17-GKAPREYTYW 18-LKEVCATPAYEAV 19-STQPRDSLNTTQL	0% 0% 0% 0% 0% 50% 0% 0% 0%
A7	conserved hypothetical protein (322aa/ 13,66))	20-QRKAKEAQAQAQK 21-RKQELERAQRE 22-KAKKEAPAN 23-EVRVPLPAVNV	63% 0% 56% 80%
C10	putative IgE-dependent histamine-releasing factor (170 aa/ 13,52)	24-IPEGNDEDPDNGMI 25-NAAAFVKKV	93% 89%
A4	Enolase (429aa/ 12,82)	26-AERKMYNLTF 27-ATSFREALRM 28-ACELRDGDKARY 29-MMCELDGTKNKS 30-GDEGGFAPPIK	60% 80% 83% 67% 90%
A7	peptidase m20/m25/m40 family-like protein, partial (343aa /12,53)	31-YGHMDKQPPL 32-PQFDPEWAT 33-AIASLQRHGVPHG 34-GGVVPTDFRIT	100% 78% 62% 82%
C2	conserved hypothetical protein (501 aa /11,77)	35-PILVPGWENAAAAN 36-EPKDAFPATGKV 37-KLDITGKPMV 38- GNSWDKVSSVVG 39-NNNIDPTKIG	57% 75% 70% 77% 60%
C1	putative aconitase	40-SCTNTSNPTVL	91%

	(896aa /9,48)	41-GFKGFGIPEGE 42-FYGPVVDAL 43-NQRIEMQRNRER 44-IVPPGSGIVHQ 45-FDWKNNCTK 46-YLKNTNRSAEHV 47-LRVPPGIKTS	72% 89% 83% 100% 44% 58% 90%
C12	small myristoylated protein 1 (131 aa /7,63)	48-NKKKKQWAYY	90%
C5/C7	putative succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain (413 aa /7,52)	49-GPKGQLVNTL 50-GRGKGVFKDGFQ 51-KIKTMKVVN	0% 67% 67%
B1	putative heat shock protein (821aa /7,18)	52-EVEEAPAPAAAPA 53-AATDPRVKADV 54-GVKEIVQSCNY 55-LDLGYGATDF 56-ASLKETESEGQVV	0% 0% 0% 70% 77%
C9	putative mitochondrial peroxiredoxin (226 aa/ 6,19)	57-STINDLPVGRNVDE	79%
A1	putative trypanothione synthetase (652aa/ /5,06)	58-VSYYESNEHF 59-DLLLGDDWEIL 60-NHPEHPAILKAE	50% 45% 58%
B2	conserved hypothetical protein (199 aa/ /5,02)	61-YRGADVCND	0%
A10	conserved hypothetical protein (1081 aa/ 4,90)	62-HYCAALQETRE 63-MRAQGDEEAAR 64-EQRAASAAQAS 65-PVPRSQWVESA 66-LAHMTTVEK	0% 0% 0% 82% 0%
C11	paraflagellar rod protein 1 (595 aa /4,20)	67-GVKARYDKTNQDL 68-SDWSETQRQKLR	77% 100%

*Spots numerados de acordo com as membranas (M).

7.10 Imunoensaio em técnica de *spot* síntese

Os 68 peptídeos selecionados (tabela 5) foram sintetizados em membrana de celulose, e testados usando *pools* de soros de pacientes diagnosticados com LT e LV, e indivíduos saudáveis. A Figura 24 mostra uma região da membrana, em triplicata, revelada com soro controle (A), soro de LV (B) e soro de LT (C).

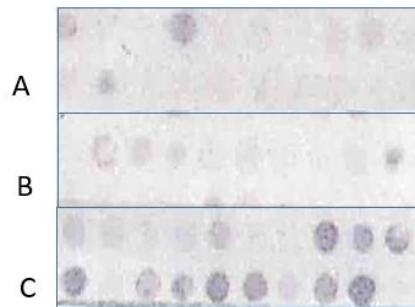


Figura 24: Imagem representativa do ensaio em membrana de nitrocelulose: Os *pools* de soros de controle (A), LV (B) e LT (C) foram testados três vezes variando a membrana, que foi confeccionada em triplicata.

Após adquirir as intensidades de todos os *spots*, em relação aos *pools* de soros, foi calculada a intensidade relativa (IR), e assim foi possível destacar alguns peptídeos como potenciais antígenos para utilização no diagnóstico sorológico da LT. Considerando a $IR > 2$, entre soros de cada forma clínica em relação ao controle, LT/C ou LV/C, os peptídeos 1, 2, 3, 9, 13, 26, 30, 32, 33 apresentam potencial como antígenos no diagnóstico de LT e LV. No entanto quando adicionamos ao critério acima a $IR > 2,0$ entre LT/LV, observamos que o peptídeo 59, apresenta potencial para LV enquanto os peptídeos 1, 3, 13, 30 e 33 seriam potenciais antígenos específicos para LT (Figura 25).

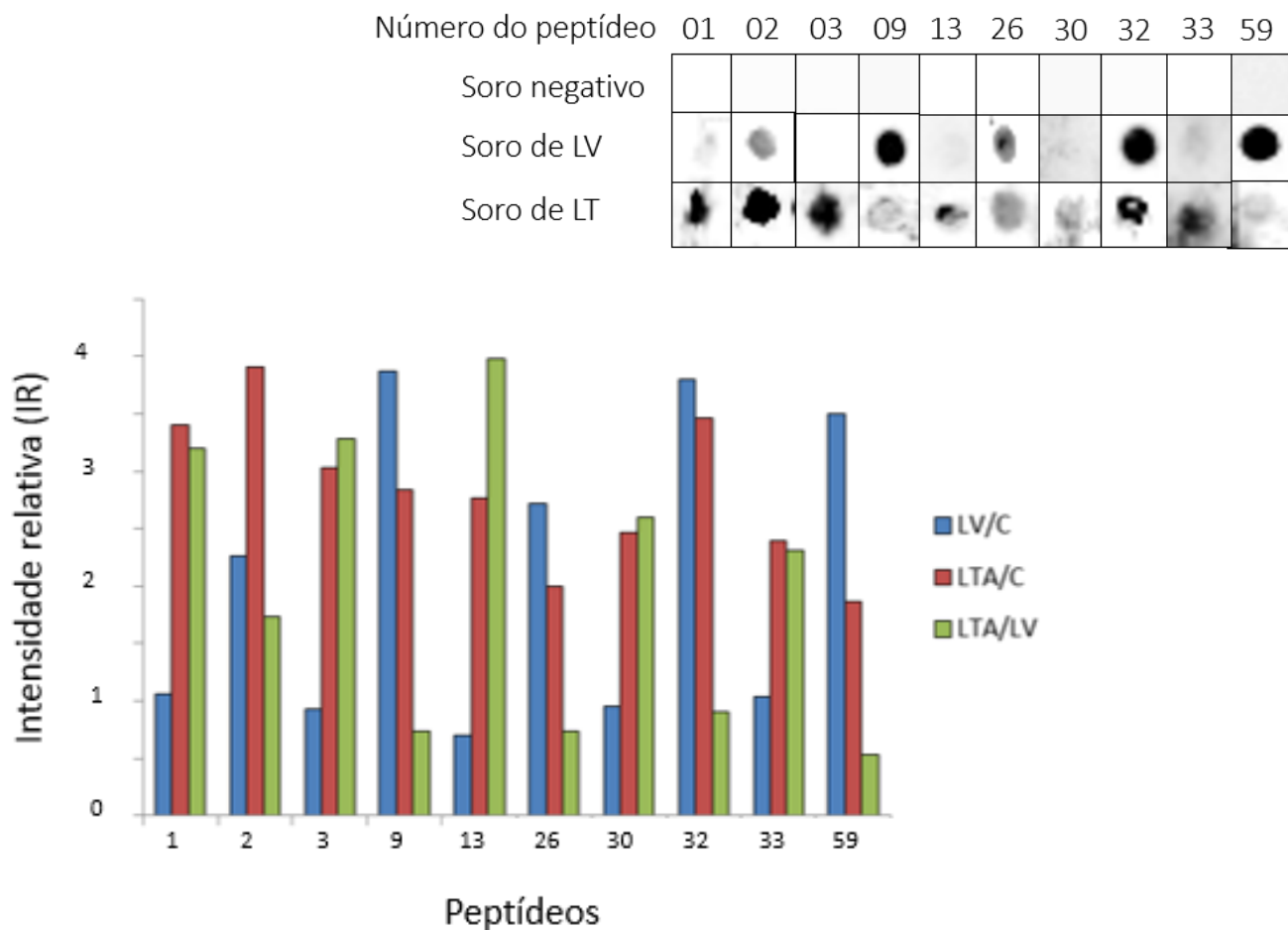


Figura 25: Peptídeos reativos ao *pool* de soros de humanos diagnosticados com LT ou LV. Para avaliar a reatividade dos *pools* dos soros de cada condição (LT, LV e controle) foi usada uma intensidade relativa > 2 entre as três situações. Somente os peptídeos com IR>2 para alguma das relações (LV/C;LT/C;LT/LV) estão demonstrados. A figura mostra resultados representativos do *imunoblot* empregando uma membrana de *spot* síntese e *pools* de indivíduos saudáveis (soro negativo) e de pacientes com LT ou LV (soro positivo). A reação foi revelada com anticorpo anti-IgG humano. As sequências desses peptídeos e as proteínas das quais eles fazem parte estão representados na tabela 5.

Considerando os dados analisados, podemos destacar duas proteínas de *L. amazonensis* que apresentam potencial para diagnóstico diferencial da LT: metalo-peptidase Clan MA(E) Família M3, e uma proteína hipotética (GI 134063939). Ambas são mais abundantes nessa espécie, apresentam reatividade exclusiva ao *pool* de soros de LT e a maioria dos epítopos preditos não apresenta similaridade com os ortólogos em *T. cruzi*. Além disso, 9 epítopos (Figura 30), provenientes das proteínas: fator de alongação 2 (epítopos 1,2,3,9), metalo-peptidase [Clan MA(E)-Família M3] (epítipo 13), Enolase (epítopos 26,30), peptidase parcial m20/m25/m40 família-like (epítopos 32,33), todos relativos ao extrato protéico de *L. amazonensis*, se mostraram potenciais para utilização como antígeno no diagnóstico sorológico da LT em humanos. Cinco destes nove epítopos (1,3,13,30 e 33) apresentaram potencial para distinguir as duas formas clínicas da doença: tegumentar e visceral (Tabela 6).

Tabela 6: Proteínas identificadas pela imunoproteômica e os seus epítopos selecionados como potenciais para o diagnóstico sorológico da Leishmaniose Tegumentar.

<i>Spot</i>	Proteína	Epítopos preditos
A5/A9	elongation factor 2 (845aa)	1 VSPVVRVAVEAKNP 2 FVKTLQNVNWWW 3 GAPLKISEPVVS 9 LADNYEWDVQEAR
A2	metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 (685aa)	13 GIAPPNRTFQ
A4	Enolase (429aa)	26 AERKMYNLTF 30 GDEGGFAPPIK
A7	peptidase m20/m25/m40 family-like protein, partial (343aa)	32 PQFDPEWAT 33 AIASLQRHGVPHG

8 DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas importantes, considerando a ocorrência em extensa área geográfica e a gravidade das manifestações clínicas nas suas diversas formas. Considerando esse cenário, o diagnóstico, tratamento e vacinação eficientes são essenciais para o controle dessas endemias. Nesse contexto, os métodos de diagnóstico sorológico e a busca por fármacos e vacinas são ferramentas importantes.

As espécies de *Leishmania* apresentam aproximadamente 8000 genes e alto grau de sintenia, em torno de 99% (El-Sayed *et al.*, 2005; Peacock *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2012), e 94% desses genes são expressos constitutivamente (Leifso *et al.*, 2007).

Os resultados que compararam o proteoma entre espécies de *Leishmania* demonstraram uma maior divergência entre eles do que o observado entre os conteúdos gênicos, sugerindo que o nível de proteínas pode ter papel determinante na doença, que exhibe amplo espectro clínico. (Peacock *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007).

As análises do DIGE entre *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* revelaram cerca de 1100 *spots* que representam apenas 14% dos genes expressos, com cerca de 90% de similaridade. O DIGE é uma ferramenta usada principalmente para detectar proteínas abundantes, explicando assim o baixo percentual de *spots* encontrado, no total de possibilidades.

A diferença entre os números e os níveis de proteínas mostrada pelos *heatmaps* entre as espécies de *Leishmania* pode promover uma melhor compreensão das diferenças fenotípicas entre as espécies estudadas. Na América do Sul, a leishmaniose visceral é frequentemente causada pela *L. infantum*, podendo ocorrer visceralização na infecção por *L. amazonensis*, embora, em uma frequência, ainda, desconhecida. Celeste *et al.*, 2017 demonstraram isso em estudo experimental de co-infecção por *L. amazonensis* e *L. infantum* em hamsters. Ambas as espécies pertencem ao subgênero *Leishmania*, e apresentaram maior número de proteínas com abundância aumentada, em relação a outra espécie pertencente ao subgênero *Viannia*.

O *heatmap* mostrou um menor número de proteínas aumentadas em *L. braziliensis*, em relação às outras duas. O menor número de proteínas associadas às categorias funcionais relacionadas, demonstra o não favorecendo desses processos nessa espécie. Esse fato, poderia ser explicado pelo *stress* a qual cada espécie de

Leishmania é exposta no hospedeiro, nos diferentes ambientes: tegumentar e visceral (Mendonça, 2016; Saporito *et al.*, 2013).

Nas redes biológicas das proteínas diferencialmente abundantes entre as três espécies estudadas, observamos uma grande quantidade de proteínas com diferentes anotações interagindo e, assim, participando do mesmo processo biológico, o que justifica o pequeno número de categorias funcionais identificadas. De fato, na literatura têm sido demonstrado que o número de interações e a diversidade de processos biológicos são inversamente proporcionais, ou seja, a medida que a diversidade de processos aumenta, o número de interações diminui (Rezende *et al.*, 2012).

Para saber quais os processos biológicos mais significativos presentes nas redes de interações, foi avaliada a presença de processos biológicos enriquecidos das proteínas encontradas de maneira mais abundante em cada espécie. Os processos biológicos enriquecidos são aqueles cuja a fração de proteínas associadas está aumentada em relação ao esperado pelo potencial codificado no genoma, demonstrando um direcionamento para essa função na célula. Algumas proteínas, já bem caracterizadas em *Leishmania* spp e seus respectivos processos biológicos merecem destaque.

Por exemplo, a arginase, proteína que apresentou aumento de abundância, apenas em *L. amazonensis*, é uma proteína presente na classe metabolismo de nitrogênio, e está envolvida na regulação da resposta oxidativa de macrófagos, através da competição com iNOS, pela arginina. Essa competição pode favorecer o sucesso da infecção e elucidar a multiplicação elevada dos parasitos em macrófagos infectados por *L. amazonensis*. Além disso, a arginina está envolvida na nutrição de formas intracelulares, via aminoácidos e na replicação do parasito no inseto e no mamífero. (Mukbel *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2010; da Silva & Floeter-Winter, 2014; Castilho-Martins *et al.*, 2015).

A resposta ao *stress* consiste, dentre outros, nos mecanismos usados pelo parasito para evadir da resposta imune do inseto e do hospedeiro, e na maquinaria protéica para a adaptação do parasito a diferentes temperaturas, pHs e stresses nutricionais (Olivier *et al.*, 2012; Dias-Teixeira *et al.*, 2016). Nessa categoria funcional resposta ao *stress* destacamos a HSP 70, proteína que apresentou um maior número de interações, com proteínas diferencialmente abundantes, em *L. infatum*. Esse número aumentado de chaperonas pode ser devido ao ambiente que essa espécie vive, muito

mais oxidativo e estressante, quando comparado ao ambiente das espécies que causam a LT. As chaperonas apresentam um papel essencial na adaptação a mudanças ambientais e *stress*, induzido pela diferenciação evolutiva, sendo, assim, essenciais para a transmissão e patogênese de doenças (Requena *et al.* 2015; Drini *et al.*, 2016). Parasitos do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida digenético, alternando assim, entre as promastigotas extracelulares, que se desenvolvem no inseto vetor, e as amastigotas intracelulares, que se multiplicam nos macrófagos dos hospedeiros mamíferos. Essa diferenciação dos estágios é regulada por vários fatores ambientais, entre os quais, pH e temperatura, que variam de pH 7.4/26 °C no inseto para pH 5.5/37 °C nos hospedeiros vertebrados, infectados por espécies de *Leishmania* visceralizantes (Zilberstein & Shapira 1994; Sibley 2011; Drini *et al.*, 2016).

Na função sistema imune podemos destacar as proteínas relacionadas a sobrevivência do parasito no hospedeiro (Atayde *et al.*, 2016). A gp 63, proteína aumentada em *L. infatum*, está associada a dois processos biológicos enriquecidos: resposta ao *stress* e sistema imune. Essa proteína está envolvida na proteção do parasito: através da conversão do C3b e C3bi, impedindo a formação da cascata do sistema complemento (Brittingham *et al.*, 1995) e a ação de enzimas lisossomais, permitindo, assim, a sobrevivência do parasito no fagolisossomo (Chaudhuri *et al.*, 1989; Seay *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2000).

A ATPase, proteína que também possui maior número de interações, com proteínas diferencialmente abundantes, em *L. infatum*, categorizada na função transporte, está implicada na obtenção de nutrientes, em *L. infatum*. Membros da superfamília ATPase são conhecidos por estarem envolvidos em processos essenciais, como: degradação de proteína e replicação do DNA (Tucker & Sallai, 2007; Markikou-Ouni *et al.*, 2015). A proliferação de *L. infatum* depende de fosfato inorgânico exógeno, pois, esse, contribui para o crescimento e sobrevivência das formas promastigotas de *L. infatum*. (Russo-Abrahão *et al.*, 2013).

Em muitos processos biológicos enriquecidos em *L. infantum* pôde-se observar a participação de proteínas de resposta ao choque térmico tais com HSP-70. Este aumento de abundância desta classe de proteínas está em acordo com o esperado, uma vez que a temperatura no interior do corpo do hospedeiro vertebrado é mais elevada do que na pele (McCall *et al.*, 2013; Larreta *et al.*, 2004). Assim, estas proteínas seriam requisitadas

para manter o correto dobramento das proteínas do parasito sob esta condição, permitindo que os processos detectados estejam aumentados nesta espécie.

Comumente, proteínas abundantes ativam células B e T e resultam na produção de anticorpos e, assim, constituem candidatos potenciais para utilização, como antígenos, em testes sorológicos e vacinas. Efetivamente, essas proteínas têm sido utilizadas como antígenos em métodos de diagnóstico sorológico, de forma eficiente, principalmente, para LV (Shreffler *et al.*, 1993; Rafati *et al.*, 2007; Khare *et al.*, 2016). Contudo, essa aplicação para a forma tegumentar da doença é limitada devido à baixa sensibilidade e especificidade variável dos testes disponíveis atualmente. Assim, a identificação de antígenos específicos e imunogênicos de espécies de *Leishmania*, causadoras da forma tegumentar, é de fundamental importância para o desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico para essa forma clínica da doença.

Nesse estudo, nós identificamos proteínas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* abundantes e antigênicas em cada uma das espécies, em relação as outras. Dezoito proteínas foram identificadas, oito nas espécies causadoras da LT e 10 em *L. infantum*, agente etiológico da Leishmaniose Visceral. Além disso, foi feito um mapeamento de epítopos lineares para células B nessas proteínas, com o objetivo de encontrar sequências que divergem dos ortólogos em *T. cruzi*. A importância dessa triagem, deve-se ao fato de o *T. cruzi* ser filogeneticamente relacionado com *Leishmania* (McKerrow *et al.*, 1993) e assim, a reação cruzada com a Doença de Chagas nos testes sorológicos ser frequente (Mottram *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 2003).

As análises de *immunoblotting* revelaram menos que 30% dos *spots*, como sendo reativos de forma específica, considerando a espécie de *Leishmania* e o soro respectivo a cada forma clínica. As proteínas foram, então, mapeadas quanto a presença de epítopos para células B. Essa taxa, relativamente baixa, de *spots* reativos, de fato, demonstra a seleção altamente específica das 18 proteínas antigênicas, das quais, seis de *L. amazonensis*, duas de *L. braziliensis* e 10 de *L. infantum*.

A proteína hipotética (GI 134063939) e a metalo peptidase (Clan MA(E), Família M3), duas proteínas abundantes em *L. amazonensis* e reativas exclusivamente com o soro de pacientes diagnosticados com LT, apresentam muitos epítopos para células B e pouca similaridade com os ortólogos em *T. cruzi*.

As peptidases participam de várias fases do desenvolvimento de *Leishmania*. Essa classe de enzimas hidrolíticas é altamente imunogênica e tem sido usada, previamente, no diagnóstico sorológico em *Leishmania* e como componente vacinal (de Souza Dias *et al.*, 2005; de Souza *et al.*, 2012).

Um número considerável de proteínas recombinantes tem sido sugeridas como candidatas no desenvolvimento de testes sorológicos para Leishmanioses, para substituir a utilização do antígeno bruto (Faria *et al.*, 2011; Fonseca *et al.*, 2014). Embora, alguns autores tenham empregado, com sucesso, diferentes antígenos recombinantes para o diagnóstico da LT, a reação cruzada com soros de pacientes com LV não foi testada (Souza *et al.*, 2013) ou se mostrou alta (Menezes-Souza *et al.*, 2014)

Nós identificamos nove peptídeos potenciais para o diagnóstico da LT, cinco dos quais são, ainda, capazes de distinguir as duas formas clínicas da doença: Tegumentar e Visceral. Peptídeos sintéticos têm sido usados por vários grupos como antígenos em imunoenaios. Peptídeos são moléculas relativamente simples de ser sintetizadas e mais baratas de serem produzidas que proteínas inteiras. A utilização dos peptídeos aprimorou, significativamente, os imunoenaios para detecção da Leishmanioses Visceral, em relação a especificidade, quando comparada com os antígenos brutos ou recombinantes (Faria *et al.*, 2011; Faria *et al.*, 2015; Toledo-Machado *et al.*, 2015; Lage *et al.* 2016).

Este estudo apresenta alguns aspectos inovadores em termos de análise proteômica e descoberta de antígenos para diagnóstico serológico de LT, incluindo a identificação de antígenos potenciais. Outros estudos empregaram proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos (isolados ou combinados), bem como proteínas de múltiplos epítomos para o diagnóstico das Leishmanioses. Os achados nesse estudo e o conhecimento de outros trabalhos podem ajudar a desenvolver um teste de diagnóstico preciso, que exclua ou ao menos minimize a reação cruzada da LT com LV e Doença de Chagas. Estudos futuros podem utilizar soro de pacientes com outras doenças que possam dificultar o diagnóstico diferencial da LT, além da LV e Doença de Chagas, como, tuberculose, lepra e lúpus (Souza *et al.*, 2013)

9 CONCLUSÕES

Com base nos dados encontrados nesse trabalho foi possível concluir que:

1. A exploração dos dados proteômicos mostrou que quando consideramos o número e o nível de abundância das proteínas, *L. infatum* se aproxima de *L. amazonensis*, enquanto está mais distante de *L. braziliensis*
2. A diversidade de categorias funcionais sugere que *L. infatum*, espécie com maior potencial de visceralização, apresentou maior número de proteínas em quase todos os processos, sugerindo direcionamento para alguns mecanismos, dentre os quais: infecção e sobrevivência no hospedeiro.
3. Várias proteínas foram selecionadas como diferencialmente abundantes e com imunogenicidade específica para forma tegumentar ou visceral. Sendo seis provenientes de *L. amazonensis*, duas para *L. braziliensis* e 10 para *L. infatum*.
4. Metalo-peptidase, Clan MA(E), Família M3, e uma proteína hipotética (GI 134063939) apresentaram potencial para utilização no diagnóstico sorológico da LT em humanos.
5. Nove epitopos, provenientes de quatro proteínas, todos provenientes do extrato protéico de *L. amazonensis* se mostraram potenciais para utilização como antígeno no diagnóstico sorológico da LT em humanos.

Os dados gerados até o momento foram suficientes para a redação de 2 artigos científicos e um pedido de patente:

"A proteomic road to acquire an accurate serological diagnosis for human tegumentary leishmaniasis" (publicado)

"Comparative proteomics profiling between Leishmania (Leishmania) amazonensis, L. (V) braziliensis and L. (I) infatum" (em preparação)

"Peptídeos, método e kit para imunodiagnóstico de leishmaniose tegumentar e uso" (BR1020160050901)

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahluwalia S, Lawn SD, Kanagalingam J, Grant H, Lockwood DNJ 2004. Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travelers to central and South America. *BMJ*.329:842-4.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, v. 25, p. 3389-3402.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J 2004. Canine leishmaniasis. *AdvParasitol* 57:1-88.
- Alves CF, Alves CF, Figueiredo MM, Souza CC, Machado-Coelho GL, Melo MN, Tafuri WL, Raso P, Soares RP, Tafuri WL 2013. American tegumentary leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin. *PLoS One* 21;8(5).
- Araújo PR, Teixeira SM 2011. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106(3):257-66.
- Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30: 1269-1281.
- Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, *et al* 2010. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* 38: D457-62.
- Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AMP, Siqueira IC, Costa CHN, Costa DL, Holanda TA, Soares VYR, Biá M, AJM, Romero GAS, Rabello A 2008. Validation of the rapid immunochromatographic test IT-LEISH[®] for the diagnosis of human visceral leishmaniasis *Epidemiol. Serv. Saúde* v.17 n.2.
- Atayde VD, Hassani K, da Silva Lira Filho A, Borges AR, Adhikari A, Martel C, Olivier M 2016. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. *Cell Immunol.* 309:7-18.
- Baneth G, Aroch I 2008. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal* 175: 14–15.
- Bates P 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* 37 :1097–1106.
- Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, Clos J, Bruchhaus I 2003. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 3(9):1811-29.
- Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB 2000. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 63:153-157.
- Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJ, Meyer EF Jr, Brice MD, Rodgers JR, Kennard O, Shimanouchi T, Tasumi M. The Protein Data Bank. A computer-based archival file for macromolecular structures. *Eur J Biochem.* 1977 Nov 1;80(2):319-24.
- Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Schneider M, Bansal P, Bridge AJ, Poux S, Bougueleret L, Xenarios I 2016. UniProtKB/Swiss-Prot, the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View. *Methods Mol Biol.* 1374:23-54.
- Bowers PM, Pellegrini M, *et al* 2004. "Prolinks: a database of protein functional linkages derived from coevolution." *Genome Biol* 5(5): R35.

- Bray, RS 1985. Immunodiagnosis of leishmaniasis, p. 177–181. In K. P. Chang and R. S. Bray (ed.), *Leishmaniasis*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands
- Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM 1995. Role of the *Leishmania* surface protease GP63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.* 155, 3102–3111.
- Britto C, Pírmex C, Fernandes O 2005. Técnicas básicas de diagnóstico molecular em doenças infecciosas e parasitárias. In: Coura JR editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 195-23.
- Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(2):775-9.
- Cahil, KM 1970. Field technique in the diagnosis of calazar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 83:499.
- Carvalho EM, Correa-Filho D, Barcelar O, Almeida, RP, Less H, Rocha H 1995. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 53: 273-277.
- Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R 2003. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68(3):321-4.
- Castilho-Martins EA, Canuto GA, Muxel SM, da Silva MF, Floeter-Winter LM, Del Aguila C, López-González Á, Barbas C 2015. Capillary electrophoresis reveals polyamine metabolism modulation in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* wild type and arginase knockout mutants under arginine starvation. *Electrophoresis*.doi: 10.1002/elps.201500114.
- Cataldo JI, de Queiroz Mello FC, Mouta-Confort E, de Fátima Madeira M, de Oliveira Schubach A 2010. Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Clin Lab Anal* 24: 289–294. doi:10.1002/jcla.20402
- Celeste BJ, Sanchez MCA, Ramos-Sanchez EM, Castro LGM, Costa FAL, Goto H 2014. Recombinant *Leishmania infantum* Heat Shock Protein 83 for the Serodiagnosis of Cutaneous, Mucosal, and Visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 90(5), pp. 860–865.
- Celeste JLL, Moura APV, França-Silva JC, Matos DE Sousa G, Oliveira Silva S, Norma Melo M, Luiz Tafuri W, Carvalho Souza C, Monteiro DE Andrade H 2017. Experimental mixed infection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (L.) infantum* in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Parasitology.* 144(9):1191-1202.
- Chamond N, Goytia M, Coatnoan N, Barale JC., Cosson A, Degraeve WM, Minoprio P 2005. *Trypanosoma cruzi* proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. *Molecular Microbiology* 58, 46–60.
- Chaudhuri G, Chaudhuri M, Pan A, Chang KP 1989. Surface acid proteinase (GP63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-

- encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J. Biol. Chem.* 264, 7483–7489.
- Chavali AK, Whittimore JD, Eddy JA, Williams KT, Papin JA 2008. Systems analysis of metabolism in the pathogenic trypanosomatid *Leishmania major*. *Mol Syst Biol*, 4:177.
- Chavali AK, Blazier AS, Tlaxca JL, Jensen PA, Pearson RD, Papin JA 2012. Metabolic network analysis predicts efficacy of FDA-approved drugs targeting the causative agent of a neglected tropical disease. *BMC Syst Biol.* 27;6:27.
- Chen DQ, Kolli BK, Yadava N, Lu HG, Gilman-Sachs A, Peterson DA, Chang KP 2000. Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of GP63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infect. Immun.* 68, 80–86.
- Choudhry A, Guru PY, Saxena RP, Tandon A, Saxena KC 1990. Enzyme linked immunosorbent assay in the diagnosis of Kala-zar in Bhadohi (Varanasi), India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 84:363-366.
- Chuang HY, Hofree M, Ideker T 2010. A decade of systems biology. *AnnuRevCell Dev Biol.* 26:721–44.
- Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, Christmas R, Avila-Campilo I, Creech M, Gross B, Hanspers K, Isserlin R, Kelley R, Killcoyne S, Lotia S, Maere S, Morris J, Ono K, Pavlovic V, Pico AR, Vailaya A, Wang PL, Adler A, Conklin BR, Hood L, Kuiper M, Sander C, Schmulevich I, Schwikowski B, Warner GJ, Ideker T, Bader GD 2007. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc.* 2(10):2366-82.
- Coelho VTS, Oliveira JS, Valadares DG, Chávez-Fumagalli MA, Duarte MC, Lage PS, Soto M, Santoro MM, Tavares CAP, Fernandes AP, Coelho EAF 2012. Identification of Proteins in Promastigote and Amastigote-like *Leishmania* Using an Immunoproteomic Approach. *Plos Neglected Disease.* Volume 6 | Issue 1 | e1430
- Cohen-Freue G, Holzer TR, Forney JD, McMaster WR 2007. Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol.* 37(10):1077-86.
- Costa MM, Andrade HM, Bartholomeu DC, Freitas LM, Pires SF, Chapeaurouge AD, Perales J, Ferreira AT, Giusta MS, Melo MN, Gazzinelli RT 2011. 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. *J. Proteome Res.* 10, 2172–2184.
- Cupolillo E 2005. Avanços dos estudos moleculares de *Leishmania (Leishmania) chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Informe final. Brasília, Brasil. [acessado em 04 de janeiro de 2013] http://www.panaftosa.org.br/Comp/Zoonoses/Leishma/doc/Inf_final_leish_005.pdf.
- da Silva MF, Floeter-Winter LM 2014. Arginase in *Leishmania*. *Subcell Biochem.* 74:103-17.
- da Fonseca Pires S, Fialho LC Jr, Silva SO, Melo MN, de Souza CC, Tafuri WL, Bruna Romero O, de Andrade HM 2014. Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach. *J Proteome Res.* 4;13(4):1860-72. doi: 10.1021/pr400923g.

- Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D 2010. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog.* 17;6(6).
- Date SV, Stoeckert CJ 2006. "Computational modeling of the *Plasmodium falciparum* interactome reveals protein function on a genome-wide scale." *Genome Res* 16(4): 542-549.
- de Assis RR, Ibraim IC, Nogueira PM, Soares RP, Turco S J 2012. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820, 1354–1365.
- de Gaudenzi JG, Noé G, Campo VA, Frasch AC, Cassola A 2011. Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem.* 51, 31–46.
- de Las Rivas J, Fontanillo C 2010. Protein–Protein Interactions Essentials: Key Concepts to Building and Analyzing Interactome Networks. Lewitter F, ed. *PLoS Computational Biology* 6(6):e1000807.
- de Souza Dias S, da Costa Pinheiro PH, Katz S, dos Santos MR, Barbiéri CL 2005. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* suitable for serodiagnosis of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 72(2):126-32.
- de Souza CM, Silva ED, Ano Bom AP, Bastos RC, Nascimento HJ, da Silva Junior JG 2012. Evaluation of an ELISA for canine leishmaniasis immunodiagnostic using recombinant proteins. *Parasite Immunol* 34(1):1-7.
- Dea-Ayuela MA, Rama-Iñiguez S and Bolás-Fernández F 2006. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics* 6, 4187–4194.
- Desjeux P 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol.* 14: 417–423.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27: 305–318.
- Dias-Teixeira KL, Pereira RM, Silva JS, Fasel N, Aktas BH, Lopes UG 2016. Unveiling the role of the integrated endoplasmic reticulum stress response in *Leishmania* infection – Future Perspectives. *Frontiers in Immunology | Volume 7 | Article 283.*
- Drini S, Criscuolo A, Lechat P, Imamura H, Skalicky T, Rachidi N, Lukes J, Dujardin JC, Spa GF 2016. Species- and Strain-Specific Adaptation of the HSP70 Super Family in Pathogenic Trypanosomatids. *Genome Biol. Evol.* 8(6):1980–1995.
- Duarte MC, Pimenta DC, Menezes-Souza D, Magalhães RDM, Diniz JLC, Costa LE, Chávez-Fumagalli MA, Lage PS, Bartholomeu DC, Alves MJM, Fernandes AP, Soto M, Tavares CAP, Gonçalves DU, Rocha MOC, Coelho EAF 2015. Proteins Selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol.* 22(11): 1187–1196.
- El Fakhry Y, Ouellette M, Papadopoulou B. 2002. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, 2(8): 1007-17.
- El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V 2008. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J Mol Recog* 21, 4: 243 – 255.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, et al 2005. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309:404–9.

- Faria AR, Costa MM, Giusta MS *et al* 2011. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 5(9): 1-9.
- Faria JP, Overbeek R, Xia F, Rocha M, Rocha I and Henry CS 2014. Genome-scale bacterial transcriptional regulatory networks: reconstruction and integrated analysis with metabolic models. *Brief Bioinform.* 15(4):592-611.
- Faria AR, Veloso LC, Coura-Vital W, Reis AB, Damasceno LM, Gazzinelli RT, Andrade HM 2015 Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum* Infected Dogs. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Volume 9 | Issue 1 | e3429
- Ferguson MA 1997. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 352, 1295–1302.
- Flórez AF, Park D, Bhak J, Kim BC, Kuchinsky A, Morris JH, Espinosa J, Muskus C 2010. Protein network prediction and topological analysis in *Leishmania major* as a tool for drug target selection. *BMC Bioinformatics.* 27;11:484.
- Fonseca AM, Faria AR, Rodrigues FT *et al* 2014. Evaluation of three recombinant *Leishmania infantum* antigens in human and canine visceral leishmaniasis diagnosis. *Acta Trop* 137:25-30.
- Forgber M, Basu R, Roychoudhury K, Theinert S, Roy S, Sundar S, Walden P. 2006. Mapping the Antigenicity of the Parasites in *Leishmania donovani* Infection by Proteome Serology. *PLoS ONE* | www.plosone.org 1 December 2006 | Issue 1 | e40
- Galvão-Castro B, Sa Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi MC, Countinho SG, Lambert PH 1984. Polyclonal B-cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human visceral leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 56:58–66.
- Ghosh Dastidar B, Neogy A, Nandy A 1983. Serologic studies in kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis. In: *Proceedings of the Indo-UK workshop of leishmaniasis*. New Delhi: Indian Council of Medical Research.138:43.
- Gongora R, Acestor N, Quadroni M, Fasel N, Saraiva NG, Walker J. 2003. Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. *Biomedica*, 23(2): 153-60.
- Gontijo B, Carvalho M 2003. Leishmaniose tegumentar Americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*36(1):71-80.
- Gontijo CMF, Melo MN 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. bras. epidemiol.* 7(3): 338-349.
- Goto H, Lindoso JA 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 8(4):419–33. doi:10.1586/eri.10.19.
- Gradoni L, Gramiccia M 2008. Leishmaniosis. In: *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*, Office International des Epizooties, Paris. 1: 240–250.
- Gramiccia M 2011. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*181: 23– 30.
- Grevelink SA, Lerner EA 1996. Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 34:257–72.

- Grimaldi G, Tesh RB 1993. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*. p. 230-250 vol. 6, no. 3.
- Gualda KP, Marcussi LM, Neitzke-Abreu HC, Aristides SM, Lonardoni MV, Cardoso RF, Silveira TG 2015. New primers for detection of *Leishmania infantum* using polymerase chain reaction. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 57(5):377-83.
- Guimarães MC, Celeste BJ, Corrales EM, Antunes CM, 1991. Comparison on the performance of *Leishmania major*-like and *Leishmania braziliensis* as antigen for New World leishmaniasis IgG-immunofluorescence test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 33: 503–508.
- Hailu A, Gramiccia M, Kager PA, 2009. Visceral leishmaniasis in Aba-Roba, south-western Ethiopia: prevalence and incidence of active and subclinical infections. *Ann Trop Med Parasitol*;103: 659-670.
- Haldar JP, Ghose S, Saha KC, Ghose AC 1983. Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis. *Infect. Immun.* 42:702-7.
- Han J, Collins LJ 2012. *Research Article*: Reconstruction of Sugar Metabolic Pathways of *Giardia lamblia*. *International Journal of Proteomics*. ID 980829, 9 pages.
- Harith A, Kolk AH, Leeuwenburg J, Muigai R, Huigen E, Jelsma T, Kager PA 1988. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 26(7):1321-5.
- Holzer TR, McMaster WR, Forney JD 2006. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* 146(2):198-218.
- Ihmels J, Levy R, Barkai N 2004. Principles of transcriptional control in the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 22(1):86-92.
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology.* 113: 99-113.
- Jackson AP 2015. Genome evolution in trypanosomatid parasites. *Parasitology* 142, S40–S56.
- Jamshidi N, Palsson BO 2007. Investigating the metabolic capabilities of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv using the in silico strain iNJ661 and proposing alternative drug targets. *BMC Syst Biol*, 1:26.
- Kafetzis DA, Maltezou HC 2002. Visceral leishmaniasis in paediatrics. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15(3):289-94.
- Kalter DC 1994. Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis. *Dermatol Clin* 12: 37–50.
- Kar K 1995. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol.* 21(2):123–52.
- Kaye P, Scott P 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 11;9(8):604-15.
- Kharchenko P, Church GM, Vitkup D 2005. Expression dynamics of a cellular metabolic network. *Mol Syst Biol* 1(1):msb4100023-E1.
- Khare P, Jaiswal AK, Tripathi CD, Sundar S, Dube A 2016. Immunoprotective responses of T helper type 1 stimulatory protein-S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase against experimental visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 185(2):165-79.

- Kumar A, Boggula VR, Misra P, Sundar S, Shasany AK, Dube A, 2009. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis is useful for distinguishing *Leishmania* species of visceral and cutaneous forms. *Acta Trop*; 113:202-206.
- Kumar V, Gour JK, Bajpai S, Mishra M, Singh RK, 2011. Detection of urinary antigens and their seroreactivity with serum of patients in *Leishmania donovani* infection. *Asian Pac J Trop Med*. May;4(5):367-70.
- Lage DP, Martins VT, Duarte MC, Costa LE, Garde E, Dimer LM, Kursancew AC, Chávez-Fumagalli MA, de Magalhães-Soares DF, Menezes-Souza D, Roatt BM, Machado-de-Ávila RA, Soto M, Tavares CA, Coelho EA 2016. A new *Leishmania*-specific hypothetical protein and its non-described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. 115(4):1649-58.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters Killick-Kendrick, ed.-*The leishmaniasis in biology and Medicine*. London Academic Press, v-1:1-128.
- Lainson R 1989. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: *Demography and Vector-Borne Diseases* (MW Service, ed.). 85-106, Boca Raton: CRC Press.
- Lainson R, Shaw JJ 2010. New World Leishmaniasis. Publicado Online: Mar 15. Disponível em: <http://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470688618.taw0182>
- Larreta R, Soto M, Quijada L, et al 2004. The expression of *HSP83* genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation. *BMC Molecular Biology*.5:3.
- Lawn SD, Whetham J, Chodini PL, Kanagalingam J, Watson J, Behrens RH, Lockwood DJ 2004. New world mucosal and cutaneous leishmaniasis: an emerging health problem among British travellers. *QJM*. 97:781-8.
- LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM 1993. Coupling of poly (A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* 7:996-1007.
- Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR 2007. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* 152: 455-466.
- Lima BSS, Fialho-Júnior LC, Pires SF, Tafuri WL, Andrade HM. Immunoproteomic and bioinformatic approaches to identify secreted *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. infantum* proteins with specific reactivity using canine serum. *Vet Parasitol*. 2016 Jun 15;223:115-9.
- Lima BSS, Pires SF, Fialho Junior LC, Oliveira EJ, Machado de Avila RA, Olórtgui CC, Chapeaurouge AD, Perales J e Andrade HM 2017. A proteomic road to acquire an accurate serological diagnosis for human tegumentary leishmaniasis. *Journal of Proteomics* 151:174-181.
- Lopes, AC *Diagnóstico e tratamento* 2006. Editora Manole.
- Lynch M, Conery JS 2000. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290, 1151-1155.
- Maere S, Heymans K, Kuiper M 2005. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, v. 21, p. 3448-3449.

- Maia C, Campino L 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158, 274–287.
- Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A 1995. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 59: 13–21.
- Mans DR, Kent AD, Hu RV, Lai A Fat EJ, Schoone GJ, Adams ER, Rood EJ, Alba S, Sabajo LO, Lai A Fat RF, de Vries HJ, Schallig HD 2016. Monitoring the response of patients with cutaneous leishmaniasis to treatment with pentamidine isethionate by quantitative real-time PCR, and identification of *Leishmania* parasites not responding to therapy. *Clin Exp Dermatol.* 41(6):610-5.
- Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I 2003. Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in clinical samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J. Clin Microbiol.* 41(7):3147-3153.
- Markikou-Ouni W, Drini S, Bahi-Jaber N, Chenik M, Meddeb-Garnaoui A 2015. RESEARCH ARTICLE Immunomodulatory Effects of Four *Leishmania infantum* Potentially Excreted/ Secreted Proteins on Human Dendritic Cells Differentiation and Maturation. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0143063
- Marques FA, Soares RP, Almeida GG, Souza CC, Melo MN, Pinto SA, Quixabeira VB, Pereira LI, Dorta ML, Ribeiro-Dias F, Silveira FT, Silva SM, Gontijo CM, Tafuri WL 2017. Effectiveness of an immunohistochemical protocol for *Leishmania* detection in different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasitol Int* 66(1):884-888.
- Marzochi MCA 1992. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina.* 63: 82-104.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF 1994. Leishmanioses tegumentar e visceral no Brasil - Antropozoonoses emergentes e perspectivas de controle. *Cad.SaúdePública.* 10 (2): 359-75.
- Matlashewski G 2001. *Leishmania* infection and virulence. *Medical Microbiology and Immunology.* Vol: 190: 37- 42.
- McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G 2013. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. Chitnis CE, ed. *PLoS Pathogens* 9(1):e1003053.
- Mccarthy FM, Wang N, Magee GB, Nanduri B, *et al.*, 2006. AgBase: a functional genomics resource for agriculture. *BMC Genomics*, v. 7, p. 229.
- McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J 1993. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 47:821-53.
- Meens J, Bolotin V, Frank R, Bohmer J, Gerlach GF 2009. Characterization of a highly immunogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoprotein Mhp366 identified by peptide-spot array. *Vet Microbiol* 142:293-302.
- Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA 1999. Histological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clin. Dermatol.* 17:297-304.
- Melo MN, Mayrink W, Costa CA, Magalhães PA, Williams P, Araújo FG, Coelho MV, Batista SM 1977. Padronização do antígeno de Montenegro. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 19:161-164.

- Mengistu G, Kiessling R, Akuffo H 1990. The value of a direct agglutination test in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 84(3):359-62.
- Mendes TA, Lobo FP, Rodrigues TS, Rodrigues-Luiz GF, daRocha WD, Fujiwara RT, Teixeira SM, Bartholomeu DC 2013. Repeat-enriched proteins are related to host cell invasion and immune evasion in parasitic protozoa. *Mol Biol Evol.* 30(4):951-63.
- Mendonça SCF 2016. Differences in immune responses against *Leishmania* induced by infection and by immunization with killed parasite antigen: implications for vaccine discovery. *Parasites & Vectors.* 2016;9(1):492.
- Menezes-Souza D, Mendes TAO, Gomes MS, Reis-Cunha JL, Nagem RAP, Carneiro CM, Coelho EAF, Galvão LMC, Fujiwara RT, Bartholomeu DC 2014. Epitope Mapping of the HSP83.1 Protein of *Leishmania braziliensis* Discloses Novel Targets for Immunodiagnosis of Tegumentary and Visceral Clinical Forms of Leishmaniasis *Clinical and Vaccine Immunology.* Volume 21. p. 949 –959
- Ministério da Saúde 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, Ministério da Saúde.
- Ministério da Saúde 2007. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília, Ministério da Saúde.
- Mohammadi MA, Bamorovat M, Fasihi Harandi M, Karimi T, Sharifi I, Aflatoonian MR 2017. Comparison of Three PCR-based Methods for Simplicity and Cost Effectiveness Identification of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania tropica*. *Iran J Parasitol.* 12(2):215-223.
- Mohebali M, Taran M, Zarei Z 2004. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Veterinary Parasitology.* 121: 239–245.
- Mottram JC, Brooks DR, Coombs GHc 1998. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1(4):455-60.
- Mukbel RM, Patten C Jr, Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg.* 76(4):669-75.
- Müller N, Hentrich B, Frey CF, Welle M 2015. Quantitative PCR for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis from formalin-fixed and paraffin-embedded skin sections. *Mol Cell Probes* 29(6):507-510.
- Murray HW 2000. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. *Int J Infect Dis.* 4:158-77.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 366 (9496):1561-77.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9(6):255-62.
- Notebaart RA, van Enckevort FH, Francke C, Siezen RJ, Teusink B 2006. Research article: Accelerating the reconstruction of genome-scale metabolic networks. *BMC Bioinformatics.* 13;7:296.
- Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT 2012. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect.* 14(15):1377-89.

- Pagel O, Loroach S, Sickmann A, Zahedi RP 2015. Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert Rev Proteomics* 12(3):235-53.
- Pal C, Papp B, Lercher MJ 2005. Adaptive evolution of bacterial metabolic networks by horizontal gene transfer. *Nat Genet* 37(12):1372-1375.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, *et al* 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39:839–47.
- Peters N, Sacks D 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunological Reviews*. 213: 159–179.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321(5891):970-4.
- Pedras MJ, Viana LG, Oliveira EJ de, Rabello A 2008. Comparative evaluation of direct agglutination test, rk39 and soluble antigen-ELISA and RIFI for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102:172-178.
- Plata G, Hsiao TL, Olszewski KL, Llinas M, Vitkup D 2010. Reconstruction and flux-balance analysis of the *Plasmodium falciparum* metabolic network. *Mol Syst Biol*, 6:408.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rafati S, Gholami E, Hassani N, Ghaemimanesh F, Taslimi Y, Taheri T, Soong L 2007. *Leishmania major* heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. *Vaccine*. 22;25(21):4159-69.
- Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K 2008. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20:393-413.
- Reed JL, Famili I, Thiele I, *et al* 2006. Towards multidimensional genome annotation. *Nat Rev Genet*. 7:130–41.
- Reithinger R, Quinzel RJ, Alexander B, Davies CR 2002. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic test. *Enzyme Immunosorbent-assay, PCR J. Clin. Microbiol.* 40: 2352–2356.
- Reithinger R, Dujardin JC 2007. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(1):21–25.
- Requena JM, Montalvo AM, Fraga J 2015. Molecular chaperones of *Leishmania*: central players in many stress-related and -unrelated physiological processes. *Biomed Res Int* 3013:26.
- Rezende AM, Folador EL, Resende Dde M, Ruiz JC 2012. Computational Prediction of Protein-Protein Interactions in *Leishmania* Predicted Proteomes. *PLOS ONE* | Volume 7 | Issue 12 | e51304.
- Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipngetch S, O’Keeffe C, Davidson RN 2006. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.74:76-80.

- Rocha RM, Miller K, Soares F, Vassalo J, Schenka N, Gobbi H 2009. The use of the immunohistochemical biotin-free visualization systems for estrogen receptor evaluation of breast cancer. *Applied Cancer Research*. 29(3):112-117.
- Roffi J, Dedet JP, Desjeux P, Garre' MT 1980. Detection of circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Am J Trop Med Hyg* 29: 183–189.
- Romero GAS, la Glória Orge Orge de M, de Farias Guerra MV, Paes MG, de Oliveira Macêdo V, *et al.* 2005. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop* 93: 49–56. doi:10.1016/j.actatropica.
- Ross R 1903. Note on the bodies recently described by Leishman e Donovan and further notes no Leishman`s bodies. *Brit. Med. J.* 2:1261-1401.
- Russo-Abrahão T, Alves-Bezerra M, Majerowicz D, Freitas-Mesquita AL, Dick CF, Gondim KC, Meyer-Fernandes JR 2013. Transport of inorganic phosphate in *Leishmania infantum* and compensatory regulation at low inorganic phosphate concentration. *Biochim Biophys Acta*. 1830(3):2683-9.
- Sacks D, Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* 2 (11):845-58.
- Saha S, Raghava GP 2006. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins* 65, 40–48.
- Sakharkar KR, Kumar Dhar P, Chow VTK 2004. Genome reduction in prokaryotic obligatory intracellular parasites of humans: a comparative analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1937–1941
- Salles BC, Costa LE, Alves PT, Dias AC, Vaz ER, Menezes-Souza D, Ramos FF, Duarte MC, Roatt BM, Chávez-Fumagalli MA, Tavares CA, Gonçalves DU, Rocha RL, Goulart LR, Coelho EA 2017. *Leishmania infantum* mimotopes and a phage-ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 Mar;87(3):219-225
- Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMS, Rangel EF 2015. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110(7):831–846.
- Santarém N, Tomás A, Ouaisi A, Tavares J, Ferreira N, Manso A, Campino L, Correia JM, Silva AC 2005. Antibodies against a *Leishmania infantum* peroxiredoxin as a possible marker for diagnosis of visceral leishmaniasis and for monitoring the efficacy of treatment. *Immunology Letters* 101:18–23.
- Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C 2013. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *Int J Infect Dis*. 17(8):e572-6.
- Saul J, Semiao S, 1996. Canine visceral leishmaniasis in Evora district. In: Portugal: A Seroepidemiological Study. ACP/Academic Press, Amsterdam. 9–74.
- Schmid A, Blank LM 2010. Systems biology: Hypothesis-driven omics integration. *Nat Chem Biol* 6(7):485-7.
- Schraner C, Hasse B, Hasse U, Baumann D, Faeh A, Gunther B, Grimm F, Mathis A, Weber R, Gunthard HF 2005. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. *Clin. Infect. Dis.* 40:120-4.

- Seay MB, Heard PL, Chaudhuri G 1996. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect. Immun.* 64, 5129–5137
- Sengupta PC 1969. Immunodiagnosis of Kala-azar. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 63:46.
- Shreffler WG, Burns JM Jr, Badaró R, *et al* 1993. Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp 63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. *J Infect Dis* 167(2): 426-30.
- Sibley LD 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev* 240:72–91
- Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA 1988. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82(1):66-8.
- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Brazil RP 2004. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and Molecular Research* 2:251-257.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review *Mem.Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 99(3): 239-251.
- Singh S, Sivakumar R 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J. Postgrad. Med.* 49(1):55-60.
- Song C, Chiasson MA, Nursimulu N, Hung SS, Wasmuth J, Grigg ME, Parkinson J 2013. Metabolic reconstruction identifies strain-specific regulation of virulence in *Toxoplasma gondii*. *Mol Syst Biol.* 19;9:708.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C 1996. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin.Diagn, Lab. Immunol.* 3(4):387-91.
- Souza WJ, Sabroza PC, Santos CS, De Sousa E, Henrique MF, Coutinho SG 1992. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Trop.* 52:111-119.
- Souza AP, Soto M, Costa JML, Boaventura VS, Oliveira CI, Cristal JR, Barral-Netto M, Barral A 2013. Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using *Leishmania* Recombinant Proteins. *PLOS ONE.* Volume 8 | Issue 6 | e66110.
- Struhl K 1999. Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* 98:1–4.
- Sundar SG, Singh S, Singh VP, Singla N, Kumar K, Vinayak VK. 1996. Comparative evaluation of DAT, IFAT and micro-ELISA in the serodiagnosis of Indian kala-azar. *J. Parasitic Dis.* 20:41-43.
- Sundar S, Reed SG, Singh R, Kumar PC, Murray HW 1998. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet.* 351:563-565.
- Sundar S, Rai M 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin.Diagn.Lab. Immunol.* 9(5):951-8.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C 2015. STRING

- v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue):D447-52.
- Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, de Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL 2004. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods* 292(1-2):17-23.
- Thiel M, Bruchhaus I. 2001. Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 190 (1-2): 33-6.
- Toledo-Machado CM, de Avila RA, NGuyen C, Granier C, Bueno LL, Carneiro CM, Menezes-Souza D, Carneiro RA, Chávez-Olórtegui C, Fujiwara RT 2015. Immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using mimotope peptides selected from phage displayed combinatorial libraries. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2015/401509.
- Tolezano JE, Macoris SA, Dinis JMP 1980. Modificação na epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Vale da Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 40: 49-54.
- Tucker PA, Sallai L 2007. The AAA+ superfamily—a myriad of motions. *Current opinion in structural biology*. 17(6):641–52.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.* 186:1829-34.
- Ullu E, Matthews KR, Tschudi C 1993. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol Cell Biol* 13:720–5.
- Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH 2015. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol* 16:99–109
- Van der Meide WF, Schoone GJ, Faber WR, Zeegelaar JE, De Vries HJC, Ozbel Y, Lai a Fat RFM, Coelho LIARC, Kasi M, Shallig HDFH 2005. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. *J. Clin. Microbiol.* 43(11):5560-5566.
- Vanhamme L, Pays E 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev* 59:223–40.
- Vasconcelos EJ, Terrão MC, Ruiz JC, Vêncio RZN, Cruza AC 2012. In silico identification of conserved intercoding sequences in *Leishmania* genomes: Unraveling putative cis-regulatory elements *Mol Biochem Parasitol.* 183(2):140-50.
- Vexenat AC, Santana JM, Teixeira AR 1996. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 38 (3) 177–185.
- Weigle KA, de Dávalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, et al. 1987. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg* 36: 489–496.
- Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, Saravia NG 1991. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am J Trop Med Hyg.* 44(3):260-71.
- Weiss W, Görg A 2007. Two-dimensional electrophoresis for plant proteomics. *Methods Mol Biol.*;355:121-43.

- WHO - World Health Organization Disponível em <http://www.who.int/Leishmaniasis/em_> Acesso em 4 de janeiro de 2013/2010.
- Wolf YI, Koonin EV 2013. Genome reduction as the dominant mode of evolution. *Bioessays* 35(9):829-837.
- Yang X, Yu X 2009. An introduction to epitope prediction methods and software. *Rev Med Virol* 19: 77-96.
- Yao C, Donelson JE, Wilson ME 2003. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 132(1):1-16.
- Zhao Y, Jensen ON 2009. Modification-specific proteomics: Strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* 9(20):4632-4641.
- Zilberstein D, Shapira M 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* 48:449–470.
- Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA 1991. Direct agglutination test for diagnosis and sero-epidemiological survey of kala-azar in the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 85(4):474-6.
- Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA 1992. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.* 86 (5):505-7.

11 Anexos

Tabela suplementar: Proteínas diferencialmente abundantes em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Spot*	Proteína	GI	Expressão/espécie		
			<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. infantum</i>
4	glucose regulated protein 78	16797868	●●●	●	●
5	putative chaperonin containing t-complex protein	134064799	●●●	●	●
	paraflagellar rod protein 1	51704749			
7	alpha tubulin	606648	●●●	●	×
8	paraflagellar rod protein 2C	134060772	●●●	●	●
9	putative trypanothione synthetase	322493004	●●●	●	×
10	metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3	322492700	●●●	●	●
11	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	●●●	●	●
13	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	●●●	●	×
14	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	●●●	●	×
	alpha tubulin	606648			
15	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	●●●	●	●
16	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	●●●	●	●
	alpha tubulin	606648			
17	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase 2,putative	322490347	●●●	●	●
18	putative ATPase beta subunit	68126939	●●●	●	×
21	beta tubulin	68128896	●●●	●	●
	beta tubulin	13569565			

22	putative vacuolar ATP synthase subunit b	134063609	●●●	●	●
	beta tubulin	68128896			
	beta tubulin	13569565			
24	trypanothione reductase	104745490	●●●	●	●
26	elongation factor 2 A	68129663	●●●	●	✕
28	Enolase-1	134068394	●●●	●	●
	alpha tubulin	606648			
29	trypanothione reductase	104745490	●●●	●	✕
	alpha tubulin	606648			
30	elongation factor 2 A	68129663	●●●	●	✕
	elongation factor 2 B	322490597			
31	alpha tubulin 2	322489468	●●●	●	✕
	putative guanine deaminase	322488697			
	putative guanine deaminase	134063759			
	alpha tubulin	606648			
32	peptidase m20/m25/m40 family-like protein, partial	322493954	●●●	●	●
	putative N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	68126379			
33	52 kDa PDI	116293933	●●●	●	●
34	putative ATPase beta subunit	68126939	●●●	●	✕
35	heat shock protein 70	293057	●●●	●	●
	heat shock protein 83	123665			
36	heat shock protein 70	293057	●●●	●	✕
37	heat shock protein 70	293057	●●●	●	●
38	heat shock protein 70	293057	●●●	●	✕
	heat shock protein 83	123665			
39	heat shock protein 70	293057	●●●	●	●
40	heat shock protein 83	123665	●●●	●	●
41	heat shock protein 70	293057	●●●	●	●
42	metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32	322494758	●●●	●	●
		70833719			

	carboxypeptidase, putative [Trypanosoma brucei brucei strain 927/4 GUTat10.1]				
43	Actin	28627572	●●●	●	✕
45	Actin	28627572	●●●	●	●
	alpha tubulin	606648			
46	cystathionine beta-synthase	322490120	●●●	●	●
	cystathionine beta-synthase	68125732			
48	putative 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	322493992	●●●	●	✕
	mercaptopyruvate sulfurtransferase	19572296			
51	Arginase	37964189	●●●	●	●
52	Conserved hypothetical protein-1	322489647	●●●	●	✕
53	heat shock protein 70	293057	●●●	●	●
	peptidase m20/m25/m40 family-like protein, partial	322493954			
	conserved hypothetical protein	322489647			
54	putative pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	322492470	●●●	●	●
55	alpha tubulin	322489468	●●●	●	●
	beta tubulin	68128896			
56	alpha tubulin	322489468	●●●	●	●
	beta tubulin	68128896			
57	putative adenosine kinase	322493484	●●●	●	✕
58	alpha tubulin	322489468	●●●	●	✕
59	alpha tubulin	322489468	●●●	●	✕
	conserved hypothetical protein	134063939			
60	beta tubulin	68128896	●●●	●	●
	elongation factor 2A	68129663			
61	cytochrome c oxidase subunit IV	322489399	●●●	●	●
62	ysine decarboxylase-like protein	322490177	●●●	●	●

63	Enolase	134068394	●●● ● ●
	actin	28627572	
	conserved hypothetical protein	134071548	
64	alpha tubulin	606648	●●● ● ●
	beta tubulin	68128896	
	beta-tubulin	13569565	
65	conserved hypothetical protein	134070720	●●● ● ●
	beta tubulin	68128896	
	beta-tubulin	13569565	
66	glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase, putative	322492996	●●● ● ●
67	putative RNA-binding protein	321398747	●●● ● ✕
68	alpha tubulin	322489468	●●● ● ●
	elongation factor 1-beta	322494919	
69	alpha tubulin	322489468	●●● ● ✕
	elongation factor 1-beta	322494919	
70	alpha tubulin	322489468	●●● ● ✕
	beta tubulin	68128896	
	conserved hypothetical protein	134063939	
71	alpha tubulin	322489468	●●● ● ✕
	hypothetical protein, unknown function	322488901	
	putative proteasome alpha 1 subunit	68129808	
72	beta tubulin	68128896	●●● ● ✕
73	beta tubulin	68128896	●●● ● ✕
	putative spermidine synthase	322488045	
	putative spermidine synthase	34059067	
74	beta tubulin	68128896	●●● ● ●
	heat shock protein 70	293057	

75	alpha tubulin	322489468	●●●	●	✕
	hypothetical protein, unknown function	322488901			
76	putative proteasome alpha 3 subunit	322489631	●●●	●	●
77	Enolase	134068394	●●●	●	●
	heat shock protein 70	239585967			
78	alpha tubulin	322489468	●●●	●	✕
	succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative	322490883			
	putative translation elongation factor 1-beta	134066120			
	putative heat-shock protein hsp70	134063644			
80	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	321398823	●●●	●	✕
81	alpha tubulin	322489468	●●●	●	✕
82	heat shock protein 70	293057	●●●	●	✕
83	conserved hypothetical protein	68130344	●●●	●	●
84	conserved hypothetical protein	68129693	●●●	●	●
85	conserved hypothetical protein	322489619	●●●	●	✕
	putative pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	322490383			
86	heat shock protein 70	293057	●●●	●	●
	heat shock protein 70-related protein	134062940			
	20S proteasome subunit alpha 5	322491688			
88	Phosphomannomutase	15387672	●●●	●	✕
89	heat shock protein 70	293057	●●●	●	●
90	heat shock protein 70-related protein	322492667	●●●	●	●
91	putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	68127027	●●●	●	●
92	putative proteasome alpha 1 subunit	322495730	●●●	●	●

93	putative pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	322490383	●●● ● ●
95	putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	68127027	●●● ● ●
	heat shock protein 70	239585967	
97	Peroxidoxin	322491865	●●● ● ●
98	putative cytochrome c oxidase subunit V	322492714	●●● ● X
	Chain A, Open And Closed Structures Of The Udp-Glucose Pyrophosphorylase	134105141	
99	Peroxidoxin	322491865	●●● ● X
100	Phosphomannomutase	15387672	●●● ● ●
101	conserved hypothetical protein	322493705	●●● ● X
102	ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor, putative	322489787	●●● ● ●
103	heat shock protein 70	293057	●●● ● X
104	cytosolic tryparedoxin	157781821	●●● ● ●
105	putative endoribonuclease L-PSP (pb5)	322491882	●●● ● ●
	conserved hypothetical protein	68127996	
107	putative endoribonuclease L-PSP (pb5)	322491882	●●● ● ●
110	paraflagellar rod protein 1D	27977612	●●● X ●
111	putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor	68127922	●●● X ●
112	beta tubulin	68128896	●●● X ●
	putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor	68127922	
	metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3	322492700	
113	glucose-regulated protein 78	16797868	●●● X ●
114	alpha tubulin	322489468	●●● X ●
	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	134074164	

115	beta tubulin putative seryl-tRNA synthetase paraflagellar rod protein 2C	68128896 322489210 134060772	●●● X ●
116	beta tubulin putative heat shock protein	68128896 322490382	●●● X ●
117	alpha tubulin beta tubulin 52 kDa PDI	322489468 68128896 116293933	●●● X ●
118	putative ATPase beta subunit 52 kDa PDI	68126939 116293933	●●● X ●
119	heat shock protein 70 Heat shock protein 83 conserved hypothetical protein calpain-like cysteine peptidase	293057 123665 322491186 322491416	●●● X ●
120	trypanothione reductase	104745490	●●● X ●
121	putative peptidase M20/M25/M40	322494663	●●● X ●
123	Heat shock protein 83	123665	●●● X ●
126	GDP-mannose pyrophosphorylase	12584592	●●● X ●
130	conserved hypothetical protein	134068933	●●● X ●
132	beta tubulin enolase putative reiske iron-sulfur protein precursor	68128896 134068394 134065592	●●● X ●
133	actin	28627572 68127416	●●● X ●

	putative serine/threonine protein phosphatase catalytic subunit	68130221	
	putative G-actin binding protein		
134	beta tubulin	68128896	●●● X ●
139	glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase,putative	322492996	●●● X ●
140	putative heat shock protein	322490382	●●● X ●
141	branched-chain amino acid aminotransferase,putative	322493022	●●● X ●
	conserved hypothetical protein	134064296	
142	Peroxidoxin	322491865	●●● X ●
143	putative proteasome beta 3 subunit	68127358	●●● X ●
144	putative proteasome beta 3 subunit	68127358	●●● X ●
	cytosolic tryparedoxin peroxidase	61619791	
146	conserved hypothetical protein	322489475	●●● X ●
147	alpha tubulin	322489468	●●● ● ●
	cofilin-like protein	322488736	
	actin severing and dynamics regulatory protein	68566348	
148	probable ubiquitin-conjugating enzyme e2-17 kda	11022580	●●● X ●
200	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	● ●●● ●
201	putative heat shock protein	322490382	● ●●● ●
	putative heat shock protein	134061093	
		68127922	

	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor		
202	glucose-regulated protein 78	16797868	● ●●● ●
	putative glucose-regulated protein 78	134063480	
	putative beta-fructofuranosidase	322504205	
	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	
203	heat shock protein 70	293057	● ●●● ●
	glucose-regulated protein 78	16797868	
	heat shock protein 70-related protein	134062940	
	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	
204	heat shock protein 70	293057	● ●●● ●
	putative heat-shock protein hsp70	134063644	
	heat shock protein 70-related protein	134062940	
	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	
205	glucose-regulated protein 78	16797868	● ●●● ●
	putative glucose-regulated protein 78	134063480	
	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	
206	paraflagellar rod protein 1D	27977612	✕ ●●● ●
	paraflagellar rod protein 1D	134064346	

207	paraflagellar rod protein 1D paraflagellar rod protein 1D	27977612 134064346	● ●●● ●
208	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	✕ ●●● ●
210	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922 134064193	● ●●● ●
211	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922 134064193	● ●●● ●
214	putative T-complex protein 1, theta subunit paraflagellar rod protein 1	68130360 51704749	● ●●● ●
215	putative ATPase beta subunit putative ATPase beta subunit enolase	68126939 134062671 134068394	● ●●● ●
216	putative vacuolar ATP synthase subunit b	134063609	● ●●● ●
217	paraflagellar rod protein 1D paraflagellar rod protein 1D	27977612 134064346	● ●●● ●
218	putative carboxypeptidase	134065382	● ●●● ●
219	putative peptidase M20/M25/M40 enolase	134065290 134068394	✕ ●●● ●
220	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	● ●●● ●

	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase Enolase	321398823 134068394	
221	putative seryl-tRNA synthetase enolase	322489210 134068394	● ●●● ●
222	putative T-complex protein 1, beta subunit	134063213	● ●●● ●
223	putative carboxypeptidase	134060164	● ●●● ●
225	Sequence 96 from patent US 6500437 alpha tubulin	29699212 606648	● ●●● ●
226	Adenosylhomocysteinase alpha tubulin	284794943 606648	● ●●● ●
227	Actin alpha tubulin	28627572 606648	● ●●● ●
228	Actin	28627572	✕ ●●● ●
229	S-adenosylhomocysteine hydrolase	159402	● ●●● ●
230	conserved hypothetical protein cysteine peptidase A (CPA) conserved hypothetical protein	134061620 134061296 134059457	✕ ●●● ●
231	putative NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	134060140	✕ ●●● ●
233	putative proliferative cell nuclear antigen (PCNA)	134060612	✕ ●●● ●
234	putative glutamine synthetase calmodulin-like protein containing EF hand domain	134059293 134067555	● ●●● ●

236	cystathionine beta-synthase	134068777	● ●●● ●
	putative succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	68129949	
	putative succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	134066278	
237	cystathionine beta-synthase	134068777	● ●●● ●
	putative aspartate aminotransferase	134065530	
238	putative transaldolase	134068657	● ●●● ●
	putative transaldolase	134060699	
	putative RNA-binding protein	12311843	
239	cytochrome c oxidase subunit IV	134060127	✕ ●●● ●
240	elongation factor 2	86161656	● ●●● ●
242	activated protein kinase C receptor LACK	11139411	● ●●● ●
	activated protein kinase C receptor LACK	68127629	
243	elongation factor 1-beta	134061398	● ●●● ●
244	putative proteasome alpha 3 subunit	134060339	● ●●● ●
245	putative 2,4-dihydroxyhept-2- ene-1,7-dioic acid aldolase	134062713	● ●●● ●
246	putative 2,4-dihydroxyhept-2- ene-1,7-dioic acid aldolase	134062713	● ●●● ●
247	putative proteasome beta 3 subunit	134063366	● ●●● ●
248	putative 2,4-dihydroxyhept-2- ene-1,7-dioic acid aldolase	134062713	● ●●● ●
249	Peroxidoxin	134062125	● ●●● ●
250	GTP-binding protein homologue	349484	✕ ●●● ●

251	putative phosphomannomutase conserved hypothetical protein	134066180 68128613	X ●●● ●
252	tryparedoxin peroxidase programmed cell death 6 protein-like protein	134060577 134060275	● ●●● ●
254	tryparedoxin peroxidase	134060577	● ●●● ●
255	putative ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor	134060501	● ●●● ●
256	putative 40S ribosomal protein S12]	134060194	● ●●● ●
257	tryparedoxin programmed cell death 6 protein-like protein	134063791 134060275	● ●●● ●
258	putative heat shock protein	134061093	● ●●● ●
259	enolase	134060435	● ●●● ●
260	elongation factor EF-1a	1857215	X ●●● ●
263	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	134074164 134066187	● ●●● X
264	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	134074164 134066187	● ●●● X
265	paraflagellar rod protein 2C	134060772	● ●●● X
266	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	321398823 134066655	● ●●● X
272	putative RNA helicase	134061910	● ●●● X
273	Actin	12311849	● ●●● X

274	Peroxidoxin	134062125	●	●●●	✕
	putative proteasome alpha 2 subunit	134061940			
275	S-adenosylhomocysteine hydrolase	159402	●	●●●	✕
	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	9550			
276	haloacid dehalogenase-like hydrolase-like protein	322505234	●	●●●	✕
277	pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit, putative	134062781	●	●●●	✕
278	conserved hypothetical protein	134061620	●	●●●	✕
	conserved hypothetical protein	134059457			
279	putative glutamine synthetase	134059293	●	●●●	✕
	putative cystathionine beta-lyase	134064972			
280	conserved hypothetical protein	68125881	●	●●●	✕
282	Enolase	134060435	●	●●●	✕
283	conserved hypothetical protein	134060431	●	●●●	✕
284	putative RNA-binding protein	134065659	●	●●●	✕
285	heat shock protein 70-related protein	134062940	●	●●●	✕
286	putative proteasome alpha 7 subunit	134063099	●	●●●	✕
287	conserved hypothetical protein	134060328	●	●●●	✕
289	Peroxidoxin	134062125	●	●●●	✕
	serine/threonine protein phosphatase I	3236432			
291	Tryparedoxin	134063791	●	●●●	✕
	tryparedoxin	322505287			
292	cofilin-like protein	134063716	●	●●●	✕
293	small myristoylated protein 1	55714656	●	●●●	✕

294	conserved hypothetical protein	134060182	● ●●● X
303	paraflagellar rod protein 2C	134060772	● ● ●●●
	calmodulin-like protein containing EF hand domain	134067555	
304	paraflagellar rod protein 2C	134060772	● ● ●●●
	calmodulin-like protein containing EF hand domain	134067555	
306	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	● X ●●●
307	calmodulin-like protein containing EF hand domain	134067555	● X ●●●
308	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	134074164	● ● ●●●
310	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	321398823	● X ●●●
311	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	134074164	● ● ●●●
312	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	134074164	● ● ●●●
313	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	● ● ●●●
314	putative heat shock 70-related protein 1,mitochondrial precursor	68127922	● ● ●●●
316	putative T-complex protein 1, theta subunit	68130360	● X ●●●
317	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	134074164	● X ●●●
318	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	134074164	● ● ●●●
319	putative ATPase beta subunit	68126939	● X ●●●
320	conserved hypothetical protein	134069786	● ● ●●●
321	elongation factor EF-1a	1857215	● ● ●●●

322	protein disulfide isomerase	134073774	● X ●●●
324	putative vacuolar ATP synthase subunit b	134085080	● ● ●●●
	trypanothione reductase	322496428	
325	putative vacuolar ATP synthase subunit b	134085080	● X ●●●
	trypanothione reductase	322496428	
327	Enolase	134068394	● ● ●●●
328	protein disulfide isomerase	134073774	● X ●●●
330	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	134074164	● ● ●●●
	pyruvate kinase	134073189	
331	actin	12311849	● ● ●●●
332	alpha tubulin	322489468	● ● ●●●
334	cystathionine beta-synthase	134068777	● X ●●●
	putative aldose 1-epimerase	134073282	
335	putative vacuolar ATP synthase subunit b	134085080	● ● ●●●
	GDP-mannose pyrophosphorylase	134069789	
336	protein disulfide isomerase	134073774	● X ●●●
	conserved hypothetical protein	321438663	
338	cytochrome c oxidase subunit IV	134060127	● ● ●●●
	cytochrome c oxidase subunit IV, partial	6468043	
	protein disulfide isomerase	134073774	
	actin	12311849	
340	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	134074164	● X ●●●
	actin	12311849	

	putative isocitrate dehydrogenase	68129089	
341	putative inosine-adenosine-guanosine-nucleoside hydrolase	134071171	● ● ●●●
	inosine-adenosine-guanosine-nucleoside hydrolase, putative	322500939	
343	S-adenosylmethionine synthetase	321398550	● X ●●●
344	alpha tubulin	322489468	● ● ●●●
	conserved hypothetical protein	134063939	
345	putative aconitase	134068962	● X ●●●
	zeta-crystallin/NADPH-oxidoreductase-like protein	112383450	
346	putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase	134069817	● ● ●●●
	putative protein disulfide isomerase	134070442	
347	putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase	134069817	● ● ●●●
348	gp63 protein	159323	● X ●●●
	gp63	253400290	
349	putative reiske iron-sulfur protein precursor	321398726	● X ●●●
350	putative translation elongation factor 1-beta	134072828	● ● ●●●
356	conserved hypothetical protein	134070112	● ● ●●●
357	putative RNA-binding protein	134065659	● ● ●●●
	putative RNA-binding protein	321398747	
358	beta tubulin	68128896	● ● ●●●
	beta tubulin	299829504	
	elongation factor 1-beta	322494919	

	putative translation elongation factor 1-beta	134074101	
359	beta tubulin	68128896	● ● ●●●
	beta tubulin	299829504	
360	beta tubulin	68128896	● X ●●●
	beta tubulin	299829504	
364	putative succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	68129949	● ● ●●●
366	alpha tubulin	322489468	● ● ●●●
	succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative	322490883	
	putative succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	68129949	
367	alpha tubulin	322489468	● X ●●●
369	putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	134062713	● ● ●●●
	putative phosphomannomutase	134074157	
370	putative proteasome activator protein pa26	134073261	● ● ●●●
372	putative translation elongation factor 1-beta	134072828	● X ●●●
373	promastigote alpha-2 subunit	12054744	● X ●●●
375	putative mitochondrial peroxiredoxin	16751316	● ● ●●●
376	putative mitochondrial peroxiredoxin	16751316	● ● ●●●
379	beta tubulin	68128896	● X ●●●
	putative IgE-dependent histamine-releasing factor	68126733	
	putative heat-shock protein hsp70	134063644	

381	putative ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor	134060501	●	●	●●●
	ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor, putative	322489787			
	p18 protein	469152			
	putative ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor	68125397			
382	alpha tubulin	322489468	●	●	●●●
	paraflagellar rod protein 1	51704749			
383	tryparedoxin	44889410	●	●	●●●
384	small myristoylated protein 1	55714656	●	✕	●●●
385	putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor	68127922	●	●	●●●
386	actin severing and dynamics regulatory protein	68566348	●	●	●●●
401	carboxypeptidase, putative	322497435	✕	●	●●●
	putative seryl-tRNA synthetase	68124775			
402	putative ATPase beta subunit	68126939	✕	●	●●●
403	succinyl-diaminopimelate desuccinylase-like protein	134071863	✕	●	●●●
404	S-adenosylhomocysteine hydrolase	159402	✕	●	●●●
	adenosylhomocysteinase	284794943			
	metallo-peptidase, Clan M-, Family M49	134067141			
405	putative vacuolar ATP synthase subunit b	134085080	✕	●	●●●
406	putative transaldolase	134068657	✕	●	●●●

407	putative serine/threonine protein phosphatase catalytic subunit	68127416	X	●	●●●
	putative serine/threonine protein phosphatase	322492798			
408	putative succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	68129949	X	●	●●●
410	putative phosphomannomutase	134074157	X	●	●●●
411	pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit, putative	134062781	X	●	●●●
413	putative mitochondrial peroxiredoxin	16751316	X	●	●●●
414	putative cytochrome c oxidase subunit V	68127244	X	●	●●●

Legenda: ●●● mais abundante ● menos abundante X ausente.

*Spots numerados de acordo com as figuras 10, 11 e 12)