



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



**Caracterização das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360
de função desconhecida em diferentes espécies de *Leishmania***

Andreza Geisiane Maia Souza

Belo Horizonte
2019



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



Caracterização das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 de função desconhecida em diferentes espécies de *Leishmania*

Orientadora: Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade
Coorientadora: Dra. Simone da Fonseca Pires

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte
2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelas bênçãos concedidas durante esta caminhada.

Agradeço aos meus pais Ivo e Terezinha, sempre foram meus maiores professores, me guiaram e sempre me guiarão ao longo de toda minha vida. Agradeço também ao apoio da minha querida e única irmã Aline, ao meu cunhado Roney e a minha sobrinha e afilhada Júlia, vocês foram à força que me impulsionou, fazendo-me acreditar que a realização do meu sonho era possível.

Ao meu amor, amigo e companheiro de todas as horas, Rodrigo. Agradeço pela paciência, pelo apoio, pela força nos momentos difíceis, por todo amor e por tornar meus dias mais felizes.

Aos novos amigos que conquistei e aos velhos que compreenderam os meus dias de ausência.

À minha futura sogra, Selma, por toda a ajuda que sempre me deu. E aos demais familiares pelo apoio e incentivo.

À minha orientadora e professora Dra. Héli da Monteiro de Andrade, por toda a dedicação, paciência e carinho. Obrigada por compartilhar comigo toda sua experiência e conhecimento.

À minha coorientadora Simone da Fonseca Pires, agradeço pela paciência e dedicação.

Aos meus colegas do laboratório: Adriana, Angélica, Bárbara, Flávia, Ivana, Jordanna, Joãozinho, Júnior, Ramon, Patrícia, Simone, Thaisa e Valéria que de alguma maneira me ajudaram, o convívio com cada um de vocês tornaram meus dias melhores. Agradeço também aos colegas que passaram pelo laboratório durante esses anos.

Às “lindas da Parasito” Bárbara, Flaviane, Isabela, Ludmila e Olívia por todos os momentos difíceis e divertidos que passamos juntas.

Aos amigos do René Rachou que tanto me ajudaram e fizeram parte desta conquista, mesmo sem nossa convivência diária sempre serei grata a todos vocês.

Ao professor Dr. Dawidson Assis Gomes e a Dra. Érica dos Santos Martins Duarte, pela ajuda com as técnicas e análises de imunolocalização.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFMG.

A todos os funcionários, em especial as secretarias Sibeles e a Sumara, aos professores e colegas do Departamento de Parasitologia da UFMG.

Às agências financiadoras CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

RESUMO

As Leishmanioses são doenças causadas por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* e, no Brasil, as espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* são predominantemente associadas à Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) enquanto *Leishmania infantum*, é agente da Leishmaniose Visceral (LV). Estas espécies foram utilizadas neste estudo por sua importância clínica e epidemiológica no nosso país. O sequenciamento do genoma de algumas espécies de *Leishmania* mostrou que cada genoma pode conter cerca de oito mil genes que codificam proteínas, dos quais mais da metade são genes hipotéticos. Apesar desse grande número, existem poucos dados acerca das proteínas hipotéticas e suas funções biológicas, sendo indispensáveis estudos para caracterização. Em um trabalho anterior do nosso grupo, foi realizada uma análise proteômica comparativa entre cepas de *L. infantum* com diferença de virulência. Dentre as proteínas com diferença de abundância, foram selecionadas as proteínas de função desconhecida LmxM.36.6760, aumentada na cepa mais virulenta, e LinJ.30.3360, aumentada na cepa menos virulenta. Assim, no presente estudo, foi nosso objetivo caracterizar essas duas proteínas de função desconhecida. Inicialmente, utilizamos análises de bioinformática através dos servidores NCBI, ProtParam, UniProtKB, ExPasy, que indicaram presença de sequências similares as das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 nas espécies *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* e *L. infantum*, e estas não apresentam peptídeo sinal, domínio transmembrana ou âncora GPI. A estrutura secundária predita para LmxM.36.6760 é de alfa-hélice enquanto para a proteína LinJ.30.3360 é de folha-beta. Observamos similaridade dos resultados obtidos entre os três preditores de localização celular: TargetP, WOLF PSORT e DeepLoc-1.0, que indicaram localização na mitocôndria para proteína LmxM.36.6760 e localização no citoplasma do parasito para proteína LinJ.30.3360. Os resultados de microscopia confocal mostraram-se inconclusivos quanto a localização celular das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360. Foi possível observar que ambas as proteínas apresentam abundância similar entre as espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Palavras-chave: Caracterização, *Leishmania*, predições, proteínas, proteínas hipotéticas.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by trypanosomatid protozoa of the genus *Leishmania*, and in Brazil the species *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* are predominantly associated with American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) while *Leishmania infantum* is an agent of Visceral Leishmaniasis (VL). These species were used in this study because of their clinical and epidemiological importance in our country. Sequencing the genome of some *Leishmania* species has shown that each genome can contain about 8,000 genes encoding proteins, of which more than half are hypothetical genes. Despite this large number, there are few data on hypothetical proteins and their biological functions, and studies for characterization are indispensable. In a previous study of our group, a comparative proteomic analysis was performed between *L. infantum* strains with virulence difference. Among proteins with difference in abundance, proteins of unknown function LmxM.36.6760, which increased in the most virulent strain, and LinJ.30.3360, which increased in the less virulent strain, were selected. Thus, in the present study, it was our aim to characterize these two proteins of unknown function. Initially, we used bioinformatics analysis through the servers NCBI, ProtParam, UniProtKB, ExPasy which indicated the presence of sequences similar to those of LmxM.36.6760 and LinJ.30.3360 in *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* and *L. infantum*, and these do not present signal peptide, transmembrane domain or GPI anchor. The secondary structure predicted for LmxM.36.6760 is alpha-helix whereas for LinJ.30.3360 protein is beta-pleated. We observed similarity in the results obtained among the three cell localization predictors: TargetP, WOLF PSORT and DeepLoc-1.0, which indicated localization in the mitochondria for LmxM.36.6760 protein and localization in the cytoplasm of the parasite for protein LinJ.30.3360. Confocal microscopy results were inconclusive as to the cellular localization of LmxM.36.6760 and LinJ.30.3360 proteins. It was possible to observe that both proteins present similar abundance among the species *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. infantum*.

Keywords: Characterization, *Leishmania*, predictions, proteins, hypothetical proteins.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Alinhamento e similaridade da sequência da proteína LmxM.36.6760.
- Figura 2** Alinhamento e similaridade da sequência da proteína LinJ.30.3360.
- Figura 3** Composição de aminoácidos da proteína LmxM.36.6760.
- Figura 4** Composição de aminoácidos da proteína LinJ.30.3360.
- Figura 5** Predição de fosforilação das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360.
- Figura 6** Predição de estrutura secundária das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360.
- Figura 7** Localização celular em promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. Infantum* para proteína LmxM.36.6760.
- Figura 8** Localização celular em promastigotas de *L. infantum* para proteína LinJ.30.3360.
- Figura 9** Avaliação da abundância das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 por *Western Blotting* em extratos proteicos de formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Sequência FASTA das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360.
- Tabela 2** Características físico-químicas das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360
- Tabela 3** Predição de localização celular das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
BLAST	Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (<i>Basic Local Alignment Search</i>)
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
GI	Identificador <i>GenInfo</i>
HPs	Proteínas Hipotéticas
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranoside
KDa	Kilodalton
kDNA	DNA do cinetoplasto
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LIT	<i>Liver Infusion Triptose</i>
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
Mb	Megabase
MM	Massa molar
mM	Milimolar
NCBI	Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
OD	Densidade ótica
ORF	Janela aberta de leitura (<i>Open Reading Frame</i>)
PBS	Tampão Salina Fosfato
Pfam	Base de dados de famílias de proteínas
PH	Proteína hipotética
pI	Ponto isoelétrico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	Rotação por minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro fetal bovino
T.A	Temperatura Ambiente
UniProt	Recurso de Proteína Universal (<i>Universal Protein Resource</i>)
WHO / OMS	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 <i>Leishmania</i> spp.....	11
1.2 Leishmanioses	12
1.3 Organização genômica em <i>Leishmania</i> spp.....	14
1.4 Genes hipotéticos e Proteínas hipotéticas.....	15
1.5 Análises <i>in silico</i> para predição de função de proteínas	16
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. MATERIAIS E METODOS	21
4.1 Análises de bioinformática.....	21
4.2 Materiais biológicos	21
4.2.1 Parasitos	21
4.2.2 Produção da proteína recombinante e anticorpo	22
4.3 Localização celular	23
4.3.1 Microscopia Confocal	23
4.4 Avaliação da abundância das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 em diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	24
4.4.1 Extrato proteico.....	24
4.4.2 <i>Western blotting</i>	25
4.4.3 Análise estatística	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Análises de bioinformática.....	26
5.2 Localização celular	33
5.2.1 Microscopia confocal.....	33
5.3 Avaliação da abundância das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 em diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	36
5.3.1 <i>Western blotting</i>	36
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES.....	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* spp.

Protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) pertencem à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae e são considerados de grande importância médica e veterinária. A transmissão da infecção para os hospedeiros vertebrados ocorre através da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas que pertencem à ordem Diptera, à família Psychodidae (Desjeux, 2001).

Lainson e Shaw (1987) classificaram as espécies que acometem o homem em complexos, agrupados em dois subgêneros de acordo com o seu tipo de desenvolvimento no trato digestório dos flebotomíneos: o subgênero *Leishmania*, com desenvolvimento suprapilário (predominante nos intestinos médio e anterior) e o subgênero *Viannia*, com desenvolvimento peripilário (processo de desenvolvimento com uma fase que se passa no intestino posterior). O subgênero *Leishmania* ocorre tanto no Novo como no Velho Mundo, enquanto o subgênero *Vianna* é restrito a regiões Neotropicais.

Há duas formas principais durante o ciclo de vida do parasito: promastigotas, que são formas flageladas e extracelulares, presentes no trato digestivo de insetos e amastigotas, formas não-flageladas e intracelulares obrigatórias, encontradas em células do SMF (Sistema Mononuclear Fagocítico) dos hospedeiros vertebrados (Secundino *et al.* 2005; Gossage *et al.* 2003). Durante o repasto sanguíneo, os flebotomíneos regurgitam na pele do hospedeiro juntamente com a saliva, as formas infectantes (promastigotas metacíclicas) do parasito. As células do SMF do hospedeiro endocitam estas formas, que se transformam em amastigotas e começam a se multiplicar, causando a ruptura desta célula e infectando novas células do SMF. Estudos recentes, em modelos laboratoriais, tem demonstrado a participação de neutrófilos durante o ciclo no hospedeiro vertebrado, para verificar esta migração, foi observada através da citometria de fluxo uma infiltração significativa de neutrófilos na pele de camundongos C57BL/6 acompanhada por um recrutamento considerável de macrófagos (Peters *et al.* 2008). Ao se alimentar em um hospedeiro infectado, o flebotomíneo ingere os macrófagos contendo as formas amastigotas, que após atingirem o tubo digestivo se transformam em promastigotas que se multiplicam intensamente e passam por mudanças morfológicas e fisiológicas, chamada metaciclogênese, gerando as promastigotas metacíclicas. Estas não mais se dividem, e são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (Ashford, 2000; Choi & Lerner, 2001; Bates, 2007).

No hospedeiro invertebrado, foi demonstrado que a ingestão de uma segunda refeição de sangue não infectada por flebotomíneos infectados por *Leishmania* desencadeia a desdiferenciação de promastigotas metacíclicas, considerados um estágio terminalmente diferenciado dentro do vetor, a um estágio semelhante à leptomonadas, a promastigota retroleptomonado. A metaciclogênese reversa ocorre após cada refeição de sangue subsequente, onde promastigotas de retroleptomonados se multiplicam rapidamente e se diferenciam para promastigotas metacíclicas, aumentando a infecciosidade do flebotomíneo. Esses achados colocam fontes de sangue prontamente disponíveis como um elemento crítico na transmissão e propagação de patógenos transmitidos por vetores (Serafim *et al.*, 2018).

1.2 Leishmanioses

As leishmanioses são consideradas de grande importância na saúde pública mundial, com ampla distribuição geográfica, representando um complexo de doenças de caráter crônico, com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (Ministério da Saúde, 2007). Sua importância levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a incluí-la entre as 6 doenças consideradas prioritárias em seu programa de controle (WHO, 2018), sendo considerada endêmica em 98 países em 5 continentes (Alvar *et al.* 2012).

As leishmanioses podem apresentar diversas formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da susceptibilidade do hospedeiro (Saravia *et al.* 1989): leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT); esta última é classificada de acordo com a manifestação clínica das lesões em leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose cutânea (LC) (Desjeux, 2004).

A LV acomete os órgãos internos e é a forma mais grave da doença em humanos (WHO, 2018). É uma doença infecciosa sistêmica, de evolução crônica, caracterizada por febre irregular de intensidade média e de longa duração, esplenomegalia, hepatomegalia, acompanhada de anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (Desjeux, 1996). É causada por *Leishmania (L.) donovani* no Velho Mundo, tendo como reservatório os seres humanos e *Leishmania (L.) infantum* no Sudeste da Europa, na região do Mediterrâneo e no Novo Mundo, incluindo o Brasil, tendo os cães como reservatórios domésticos (Desjeux 2004; De Oliveira *et al.* 2004).

O tratamento da LV no Brasil é realizado através dos medicamentos: antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime) e a anfotericina B, sendo esta a única opção para gestantes e pacientes que tenham contraindicações ou que manifestem toxicidade ou refratariedade em

relação ao uso dos antimoniais pentavalentes. O tratamento da LTA é feito por meio do Glucantime (antimoniato de N-metilglucamina) (Mishra *et al.* 1994; Figueiró Filho *et al.* 2005; Costa *et al.* 2007).

As ações de controle da LV preconizadas pelo Ministério da Saúde são baseadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, controle do reservatório canino e aplicação de inseticidas para os vetores (Costa; Vieira, 2001, Werneck *et al.* 2008).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença complexa e multifatorial que resulta de fatores ambientais, assim como perfil imunológico e genético do hospedeiro e é causada por diferentes espécies de *Leishmania*, que acometem a mucosa e pele (Castellucci *et al.* 2014).

Primariamente, são infecções de caráter zoonótico, acometendo o homem e seus animais domésticos de maneira secundária (Basano; Camargo, 2004). No Brasil, as principais espécies envolvidas na LTA são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.a) lainsoni* (Gontijo; Carvalho, 2003; Bassano; Camargo, 2004).

As principais manifestações observadas nos pacientes com LTA podem ser classificadas de acordo com seus aspectos clínicos, patológicos e imunológicos. A leishmaniose cutânea localizada é caracterizada por lesões indolores, ulcerosas, únicas ou múltiplas. Já a forma mucocutânea é reconhecida por lesões das mucosas que afetam as regiões nasofaríngeas. A forma disseminada apresenta múltiplas úlceras cutâneas, enquanto o aparecimento de lesões nodulares não ulceradas são características da forma difusa (Silveira *et al.* 2004; Berman 2005).

O controle da LTA deve ser flexível, distinto e adequado a cada região ou foco em particular. Para definir as estratégias de controle, devem ser considerados os aspectos epidemiológicos, com prioridade ao diagnóstico precoce, ao tratamento dos casos humanos e às atividades educativas. Para o controle de vetores, a medida recomendada consiste na utilização de inseticidas de ação residual. A indicação deste controle deverá ser determinada pelas análises conjuntas dos dados epidemiológicos e entomológicos, não sendo indicado para ambiente silvestre. Não são recomendadas ações para controle de animais domésticos com LTA (Ministério da Saúde, 2010).

1.3 Organização genômica em *Leishmania* spp.

A disponibilidade das sequências genômicas de diversos parasitos gerou um aumento progressivo no entendimento da biologia destes, possibilitando o reconhecimento de possíveis alvos para intervenção, como alvo para drogas (de Azevedo *et al.* 2009).

Os tripanosomatídeos apresentam uma única e grande mitocôndria contendo o cinetoplasto, composto por uma rede de moléculas de DNA circulares, denominado kDNA sendo dividido em: minicírculos e maxicírculos. Essas moléculas apresentam tamanho e funções diferentes e ainda representam cerca de 20 a 25% do DNA total da célula (Westenberger *et al.* 2006).

Praticamente todos os genes dos tripanosomatídeos não possuem íntrons, mas são dependentes da presença das regiões intergênicas para se expressarem, sugerindo que estas podem conter os sinais necessários para a transcrição e maturação do RNAm (Papadopoulou, 2003). A regulação da expressão de genes em tripanosomatídeos acontece principalmente durante as modificações pós-transcricionais e traducionais (Clayton *et al.* 2002; Rosenzweig *et al.* 2008; Paape *et al.* 2011).

No gênero *Leishmania* ocorre a transcrição policistrônica, gerando RNAs imaturos contendo mais de um gene, como acontece em organismos procariotos. Nesse parasito, grupos de genes codificantes de proteínas que têm uma mesma orientação em uma das fitas de DNA são transcritos simultaneamente gerando RNAm precursores policistrônicos (Haile; Papadopoulou, 2007).

Portanto cada RNAm é clivado em uma reação de *trans-splicing* que insere uma sequência em torno de 39 nucleotídeos denominada *spliced-leader* na extremidade 5' de cada RNAm. Já as extremidades 3' destes RNAm passam pelo processo de poliadenilação oferecendo maior estabilidade ao transcrito maduro (Papadopoulou *et al.* 2003).

Estes parasitos possuem o genoma com aproximadamente 32Mb e cerca de 8.300 genes. Uma peculiaridade do gênero é o agrupamento sintênico e conservação gênica, mais de 99% entre *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. Como estratégia de sobrevivência em condições de estresse, estes parasitos geralmente investem em variações no número de cópias do DNA (Laffitte *et al.* 2016).

Nos últimos anos foram realizados alguns estudos que apuraram que grande parcela dos genes codificadores em *Leishmania* são expressos constitutivamente. Contudo, em alguns casos encontram-se RNAs estágios regulados. Os produtos gênicos, fruto dessa regulação estão envolvidos em diversas vias funcionais na célula, como proteínas de

choque térmico, proteínas estruturais, transportadores, metabolismo e de superfície. (Cohen-Freue *et al.* 2007).

Uma vez que os tripanosomatídeos possuem regulação pos-transcricional da expressão genica, em *Leishmania*, os níveis de RNAm não representam a realidade absoluta da abundância de proteínas, tendo potencial de serem dados relativamente incertos, além de não esclarecer os níveis de modificações pós-traducionais, sendo capaz de mudar a função de uma dada proteína, além de aumentar o repertório proteico a partir de um conjunto determinado de genes (Anderson *et al.* 1997; Gygi *et al.* 1999).

1.4 Genes hipotéticos e Proteínas hipotéticas

A maioria dos genes identificados nos genomas sequenciados é baseada tanto na similaridade com outros genes conhecidos, quanto na significância estatística de uma sequência ser codificadora de proteína (Rogic, 2001). Na maioria dos casos é comum o gene ser identificado como uma janela aberta de leitura (ORF do inglês *Open Reading Frame*) anotada no genoma (Doolittle, 1996). Uma ORF é determinada como uma região do DNA que começa em um códon de iniciação (ATG) e finaliza em um dos códons de terminação e possivelmente, será traduzida em um polipeptídeo. Segundo o Candida Genome Database (CGD), uma ORF não é classificada como um gene até que seja demonstrada a presença de um transcrito e/ou produto proteico (Arnaud, 2005).

Genes que não foram caracterizados e suas anotações não podem ser comparadas com genes já conhecidos são chamados de genes hipotéticos. Eles podem não apresentar nenhum homólogo conhecido ou podem ser homólogos de genes com função desconhecida, dessa forma sendo chamados de genes hipotéticos conservados. Estes representam uma grande parcela nos bancos de dados disponíveis (Kolker 2004).

Koonin e colaboradores (2002) definem Proteínas Hipotéticas através de análises computacionais a partir de sequências de ácidos nucleicos. Dessa forma, tem sua existência predita, mas não se encontra evidência experimental da sua expressão. São caracterizadas por baixa identidade com as proteínas conhecidas anotadas em bancos de dados.

Peacock e colaboradores (2007) revelaram que *L. major* e *L. infantum* possuem um cariótipo de 36 cromossomos enquanto que *L. braziliensis* apresenta 35 cromossomos. Smith e colaboradores (2007) compararam os genomas de *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* dentre os genes espécie-específicos, um total de 81 genes foram identificados e mesmo entre estes, a maioria (73%) são anotados como hipotéticos. Devido a notável porcentagem de genes depositados em bancos de dados como codificadores para proteínas

hipotéticas e da relevância da definição da sua funcionalidade, diversos estudos tem sido realizados com o objetivo de identificar e caracterizar funcionalmente as proteínas hipotéticas.

1.5 Análises *in silico* para predição de função de proteínas

Para realizar as análises *in silico* para predição de função de proteínas, as ferramentas da bioinformática vêm sendo ótimas aliadas, colaborando consideravelmente para sua determinação. Diversas abordagens podem ser utilizadas para contribuir na caracterização funcional de proteínas. Dentre elas, podemos mencionar análises de similaridade, busca por domínios, predição de modificações pós-traducionais, estruturas secundárias e predição da localização celular.

1.5.1 Análise de similaridade

A análise de similaridade é útil para a descoberta de informações funcionais, estruturais e evolucionárias nas sequências biológicas de ácidos nucleicos e de aminoácidos.

Para verificar o alinhamento de sequências existem várias ferramentas disponíveis pela bioinformática que podem gerar informações sobre uma nova sequência comparando-a a outras já conhecidas por meio de acesso a banco de dados. A ferramenta mais comum de comparação de sequências com os bancos de dados genômicos é o BLAST (*Basic Local Alignment Search*). Por meio deste algoritmo é possível detectar rapidamente no banco de dados, a existência de uma sequência consideravelmente parecida com a pesquisada e exclui os resultados não proveitosos das regiões de homologia identificadas. Com esta ferramenta é possível compararmos uma sequência de DNA ou proteína com todas as sequências disponíveis nos bancos de dados públicos. Esta ferramenta pode ser utilizada para inferir relações funcionais e evolutivas entre sequências, bem como facilitar na identificação de membros de famílias de genes (Altschul *et al.*, 1990).

1.5.2 Presença de domínios

Domínios proteicos são regiões conservadas de uma determinada sequência de proteína que estão associadas a sua estrutura e função. Em geral, as proteínas apresentam um ou mais domínios funcionais. Os domínios são vistos como unidades funcionais e representam uma parte da cadeia polipeptídica que é independentemente estável, revelando capacidade para a realização de uma tarefa física/química específica ou para ligação a um dado substrato, entre outras funções. Diversas combinações de domínios criam a grande

variedade de proteínas que estão presentes na natureza. A identificação dos domínios de uma proteína pode dar informações sobre sua função (Alberts *et al.*, 2010).

O Pfam é um banco de dados de domínios e famílias de proteínas e representa uma importante ferramenta para predição de função protéica (Punta *et al.*, 2012).

1.5.3 Modificações pós-traducionais

As modificações pós-traducionais definem a plasticidade funcional e estrutural das proteínas em archaea, procariotos e eucariotos. A modificação de proteínas em múltiplos locais modula a atividade e as interações macromoleculares, e está envolvida em uma série de processos moleculares fundamentais. As modificações pós-traducionais afetam a conformação e as interações da proteína e podem mediar o sequestro de proteínas nos compartimentos celulares e organelas. Dentre as modificações pós-traducionais estão a ubiquitinação, oxidação, glicosilação, fosforilação, metilação, acetilação e outras (Jensen, 2006).

1.5.4 Estrutura proteica

São reconhecidos quatro níveis da estrutura proteica, sendo classificadas por: estrutura primária, estrutura secundária, estrutura terciária e estrutura quaternária. A estrutura primária é a sequência de aminoácidos específicos da proteína. A estrutura secundária apresenta maior complexidade apresentando arranjos espaciais de conformação da proteína, as estruturas secundárias mais importantes são a alfa-hélice e a folha-beta, se estabilizam através das pontes de hidrogênio. A estrutura terciária é a conformação tridimensional, sendo formada pela estrutura secundária; e a estrutura quaternária se forma a partir de aglomerações das estruturas terciárias (Branden & Tooze, 1999).

1.5.5 Localização celular

Para compreender as funções das proteínas é necessário a determinação de sua localização na célula. A predição de localização celular de uma proteína consiste na identificação de peptídeos sinais existentes na sequência de aminoácidos da proteína através de análises *in silico* (Emanuelsson *et al.*, 2000, Emanuelsson *et al.*, 2007). Cada proteína traz em sua estrutura a informação necessária específica para sua localização na célula. Sequências específicas de aminoácidos conhecidas por sinais topogênicos ou peptídeos sinais definem se a proteína será transportada através da membrana para o interior de uma organela, será exportada para fora da célula ou se será integrada à membrana. Estas sequências podem ser uma pequena porção de aminoácidos geralmente

no início ou final da proteína; ou podem estar localizadas no meio da proteína (Alberts *et al.*, 2010).

Diversos programas computacionais possibilitam a predição da localização celular de proteínas. O TargetP, por exemplo, prediz a localização celular de proteínas através da presença de peptídeos sinal. Este programa identifica proteínas destinadas para a mitocôndria, membrana, via secretora e outras, utilizando a informação N-terminal com confiança de 90% (Emanuelsson *et al.*, 2000, Emanuelsson *et al.*, 2007, Desler *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Na era pós-genômica, várias sequências de genomas e transcriptomas foram depositados nos bancos de dados nos últimos anos, assim, uma grande fração dos genes identificados por projetos genoma codificam um grupo de proteínas com funções desconhecidas, anotadas como proteínas preditas ou proteínas hipotéticas (HPs). Várias sequências de proteínas tornaram-se disponíveis através da tradução conceitual de janela aberta de leitura (ORF). Essas proteínas foram anotadas sem análise estrutural detalhada ou avaliação funcional. A maioria delas não é caracterizada experimentalmente. A caracterização de proteínas com função desconhecida representa um desafio tanto à genômica funcional quanto à biologia e é importante para completar a informação genômica e proteômica.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando na identificação de fatores de virulência em *L. infantum*. Neste sentido, realizamos um estudo proteômico comparativo entre duas cepas do parasito que exibem diferença de virulência quando infectam cultura de macrófagos e animais (hamsters), sendo a cepa MHOM/BR/1972/BH400 a mais virulenta e a cepa MHOM/BR/1972/BH46 a menos virulenta. As análises nos mostraram 20 proteínas com abundância aumentada na cepa mais virulenta, e 16 diminuídas. Todas essas proteínas podem estar relacionadas com o fenótipo de virulência nessa espécie. A proteína de função desconhecida LmxM.36.6760 estava 2,78 mais abundante na cepa mais virulenta enquanto a LinJ.30.3360 estava 7,4 vezes diminuída nesta cepa, sugerindo maiores investigações a cerca do papel dessas proteínas na virulência de *L. infantum* (Pires *et al.*, 2014).

No entanto, anterior ou simultâneo ao estudo do envolvimento dessas proteínas na virulência de *L. infantum*, é importante realizar a sua caracterização através de análises de bioinformática, localização celular e análise de abundância entre as espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, para uma melhor compreensão da função biológica dessas proteínas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar as proteínas de função desconhecida LmxM.36.6760 (XP_003875035.1) e LinJ.30.3360 (XP_001467184.1) nas espécies *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar a similaridade e realizar predições estruturais, funcionais e o alinhamento das sequências das proteínas de função desconhecida LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 com outras sequências depositadas em bancos de dados.
- Determinar a localização celular das proteínas de função desconhecida LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 em *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*.
- Avaliar a abundância das proteínas de função desconhecida LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 em *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*.

4. MATERIAIS E METODOS

4.1 Análises de bioinformática

Para realização da análise de bioinformática, a sequência FASTA das proteínas de função desconhecida LmxM.36.6760 (XP_003875035.1) e LinJ.30.3360 (XP_001467184.1) foram obtidas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As análises de similaridade e o alinhamento da sequência das proteínas foram realizadas através da ferramenta BlastP no servidor NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A caracterização físico-química, massa molecular teórica, ponto isoelétrico, a composição de aminoácidos e composição atômica foram obtidas através da ferramenta ProtParam no servidor Expasy (<https://www.expasy.org/>).

As predições de localização celular, de função da proteína, de peptídeo sinal, de acetilação, de fosforilação, de hélice transmembrana e se a proteína é secretada por uma via não clássica, foram previstas a partir do banco de dados DTU Bioinformatics (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>). Foi realizada uma predição de estrutura secundária através da ferramenta PSIPRED utilizando o servidor UCL *Department of computer Science* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), a predição de âncora de GPI foi realizada pela ferramenta PredGPI usando o servidor Biocomp.unibo (<http://gpqr.biocomp.unibo.it/>).

4.2 Materiais biológicos

4.2.1 Parasitos

Foram utilizadas as espécies *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/**PH8**); *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/**M2903**) e *L. infantum* (MHOM/BR/1972/**BH400**). As formas promastigotas em fase estacionária de crescimento, foram cultivadas e mantidas em meio LIT, suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) e antibiótico, em estufa B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 26 °C. Foram realizados repiques semanais a fim de obter o crescimento das culturas das espécies já mencionadas. Para realizar os experimentos de *western blotting* e localização celular, foram utilizados 1×10^9 e 1×10^5 parasitos, respectivamente. Todos os experimentos foram feitos em duplicatas com replicatas. Ambas são mantidas no Laboratório de Leishmanioses no Departamento de Parasitologia em meio de cultura, criopreservadas e em hamsters no biotério.

4.2.2 Produção da proteína recombinante e anticorpo

A produção das proteínas (rLmxM.36.6760 e rLinJ.30.3360) de forma recombinante assim como a obtenção do anticorpo policlonal em coelhos, foram realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. As proteínas recombinantes foram produzidas por meio de gene sintético adquirido da empresa *GenScript* em vetor de expressão pET28a-TEV. Este foi utilizado na transformação de *Escherichia coli* cepa BL-21 Star. Através de eletroporação realizada no aparelho *MicroPulser* (Bio-Rad) com choque de 2,50 kV.

Posteriormente, as bactérias foram semeadas em meio Agar, após 24 horas de crescimento, as colônias foram selecionadas para serem expressas. Para isto, foi realizado um pré-inóculo, em seguida, foi vertido no meio de expressão, tendo sua densidade ótica (OD) monitorada. Assim que a OD atingiu o valor de 0,6, foram adicionados ao meio 0,4mM IPTG 1M (*Isopropyl-β-thiogalactopyranoside*) e incubado a 37°C por 4 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 30 minutos em refrigeração a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet armazenado no freezer a -80°C.

Após esta etapa, as amostras foram purificadas, para isso, as bactérias foram lisadas da seguinte forma: o pellet foi descongelado e solubilizado na solução tampão do homogeneizador (Fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, DTT 1 mM). As amostras passaram pelo homogeneizador quatro vezes. Depois foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C, para a separação das porções pellet e sobrenadante. Este foi centrifugado novamente, sob as mesmas condições, e o sobrenadante resultante foi purificado por cromatografia de afinidade, utilizando coluna de níquel, no cromatógrafo AKTA™ Prime Plus (*GE Healthcare*). A amostra foi eluída em tampão contendo imidazol. O pellet foi tratado com um tampão contendo 8M de uréia, para a solubilização das proteínas, e depois foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado no AKTA™ Prime Plus (*GE Healthcare*), no qual foram realizadas duas corridas. A primeira corrida para retirar a uréia e a segunda para eluição.

Para verificar a expressão foi realizado um *Western Blotting* (WB), utilizando gel SDS-PAGE, na qual foi aplicada a proteína recombinante. Posteriormente, a proteína foi transferida para uma membrana de nitrocelulose (*Amersham Protran* 0.45µm, NC 300mm×4m 1 roll). Esta foi incubada com anticorpo anti-His, para o reconhecimento da proteína, uma vez que a proteína recombinante é fusionada a cauda de histidina. O sinal de

reconhecimento foi revelado utilizando anti-IgG de mouse conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich*).

Para obtenção de soro anti-rLmxM.36.6760 e anti-rLinJ.30.3360, um coelho foi utilizado para cada proteína, este, foi imunizado com 9 doses de 200µg das proteínas e 500µl do adjuvante Completo de Freund em intervalos de quinze dias. Quinze dias após a última imunização, foi realizada a punção cardíaca para retirada do sangue, o mesmo foi centrifugado e o soro foi armazenado no freezer -20°C, para posterior utilização. A presença de anticorpos contra cada uma das proteínas recombinantes nos soros dos coelhos imunizados foi verificada por ensaios de ELISA tendo as recombinantes como antígeno.

4.3 Localização celular

4.3.1 Microscopia Confocal

Para o ensaio de imunolocalização das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360, promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* na fase estacionária de crescimento, foram lavadas, centrifugadas (2.500 rpm a 24°C por 5 minutos) e ressuspendidas em PBS.

Inicialmente, as unidades das lamínulas (Cover Glass 22x22) foram tratadas com 500µl de poli-L-lisina por 5 minutos, em seguida foram secas em temperatura ambiente (T.A). Foi utilizada uma placa de cultura com seis poços, na qual foi posicionada uma lamínula por poço. Em seguida, foram distribuídos 1×10^5 parasitos por lamínula e os mesmos foram mantidos à T.A por 30 minutos. Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens com PBS e os parasitos foram fixados à T.A utilizando solução de formol a 4% em PBS por 30 minutos. Três lamínulas contendo os parasitos foram permeabilizadas com Triton x-100 a 0,2% por 10 minutos a 4°C em câmara úmida e as outras três lamínulas não passaram pela permeabilização. Para verificar a integridade morfológica das células, as lamínulas foram observadas em microscópio invertido.

Lamínulas em duplicata permeabilizadas e não permeabilizadas, foram incubadas com soro de anti-LmxM.36.6760 e anti-LinJ.30.3360 em uma diluição 1:50. Às outras lamínulas em duplicatas permeabilizadas e não permeabilizadas foi adicionado anti-KMP11 (*kinetoplastid membrane protein* – Cedarlane®) como controle de proteína de membrana, em uma diluição de 1:100. Ambos foram diluídos em solução de bloqueio e incubados em câmara úmida a 4°C *overnight*, protegido da luz. Após a incubação, foram realizadas três lavagens com PBS e as lamínulas foram incubadas por 1 hora com anticorpo

secundário anti-rabbit conjugado com Alexa555 (*Thermo Fisher Scientific*) para as proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 e com o anti-mouse conjugado com Alexa488 (*Thermo Fisher Scientific*) para a proteína KMP11, na diluição de 1:500, e em seguida, incubados em câmara úmida a 4°C protegidos da luz. Posteriormente, foram adicionados 2µl de *Hoechst* em PBS em todas as lamínulas. Na sequência, as lamínulas foram lavadas por três vezes e secas a T.A. As lâminas de microscopia (*superfrost slide*) foram preparadas com meio de montagem *hidromount* da *Electron microscopy Science* e foram mantidas no escuro até secarem.

As lâminas foram observadas utilizando o microscópio Confocal *Zeiss LSM 880* do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI) com o auxílio do professor Dr. Dawidson Assis Gomes. As imagens foram analisadas com o *software Zen 2*. Esse programa foi utilizado para controle do brilho e do contraste, com o objetivo de ressaltar os resultados observados, além de permitir realizar a sobreposição das imagens.

4.4 Avaliação da abundância das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 em diferentes espécies de *Leishmania*

4.4.1 Extrato proteico

Formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* foram cultivadas e mantidas em meio LIT, suplementado com 10% de SFB e antibiótico, em estufa B.O.D a 26 °C, foram utilizados 1×10^9 parasitos de cada espécie. As mesmas foram lavadas três vezes com meio de cultura RPMI (Meio *Roswell Park Memorial Institute*) sem soro fetal bovino, por meio de centrifugações a 2.500 rpm, por 10 minutos, e os pellets acondicionados em freezer -80°C.

A extração de proteínas foi realizada solubilizando os parasitos em tampão de lise (8M uréia, 2M *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. Após esse período, as amostras passaram por um processo de lise mecânica utilizando uma agulha 26G e o conteúdo foi, então, centrifugado por 30 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante aliquoteado e acondicionado em freezer -80°C. As proteínas foram dosadas utilizando o 2D-Quant kit (*GE Healthcare*) de acordo com as instruções do fabricante.

4.4.2 Western blotting

Foi realizado um *Western Blotting* (WB) para avaliar a abundância das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 em diferentes espécies de *Leishmania*. Para isto, foi utilizado gel SDS-PAGE a 12% para o fracionamento de 40 µg do extrato proteico bruto de cada espécie. O gel foi transferido para a membrana de nitrocelulose (*Amersham Protran* 0.45µm, NC 300mm×4m 1 roll), utilizando sistema semi-dry (*Amersham Biosciences*). As interações inespecíficas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado (Molico) e 0,1% de Tween-20 em PBS. As proteínas foram identificadas a partir da incubação da membrana com os soros das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360. Foram testadas três diluições do soro para cada extrato 1:50, 1:200 e 1:400, sendo a titulação 1:50 escolhida. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-rabbit IgG conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich*), diluição 1:1.000. Foi utilizado o anticorpo anti- α -Tubulina (*Sigma-Aldrich*) diluição 1:1.000 como normalizador da reação. O anticorpo secundário foi o anti-mouse IgG conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich*), diluição 1:1.000.

Para a revelação foi utilizado o kit ECL (*GE Healthcare*) de quimioluminescência. As membranas foram digitalizadas utilizando o aparelho Image Quant LAS 500 (*GE Healthcare Life Sciences*) e as intensidades das bandas foram analisadas pelo *software* ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

4.4.3 Análise estatística

Para a análise estatística dos ensaios de *western blotting*, foi construído um modelo linear generalizado (GLM, Crawley, 2013). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores p forem inferiores a 0,05 (valor de $P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* R (R Development Core Team, 2015).

5. RESULTADOS

5.1 Análises de bioinformática

A sequência FASTA das proteínas foram obtidas através do banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), como observada na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência FASTA das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360

GI/ ID	Sequência FASTA
gi 401421092 / XP_003875035.1	<pre>MFRRLSVCVPFVTTARFYTPSEELKKLYASDFER AQFPVNIWPSDSVTFKFLYKAVEPKGNFDAILK DFQTIAAAIPKLPVFWQRTVVVSEVKEFKSLSAP TTFTLEWMQSNGLDLLPDVAEVYETYVNAKT KRVTAKIYVAPGKEQDRALVEKAKGVAEQVVK DNKQFVGYTLVPKVMVDRSIVEGFAVDVQGSY VNEAVGREKEMQASGEVDYTTIPPPRLSKTTWE DNIETEVLRKYLDTLSLYDAEELKSGV</pre>
gi 146094146 / XP_001467184.1	<pre>MMYTGEIENGQMHGRGCLIYPNKEKYEGDWV YGKRHGHGVYTYADGSKYDGEWVEDKVHGK GTCYYASGNRYTGDWTFGRINGRGTLEYADGD RYDGEWKDGRMHGKGLYYYSNGDRYDGEWK DDKRHGKGTVTYAGPDGVSSEKFDGDWVEGR MQGWGKYYYADGGVYEGEWQDGKMHGKGT YIFPNGNKYEGEWCDLVKQYGVLTIVNGERY EGYWLDDKAHGTGTLTYLQGDRYTGEWYQGK KHGRGTLAYSNKDTYEGEWRNDSATGRGVLEY ANGCRYEGDWLDDRRHGEGQLLLPDGSSYEGG WVNGKKEGRARIILKCGAVFVGTWKDNRIVGQ GEFYLSENCDLNPDY</pre>

As análises de similaridade e o alinhamento da sequência das proteínas foram realizadas através da ferramenta BlastP contra o bancos de dados não redundantes, no servidor NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para a proteína LmxM.36.6760 foram encontrados 37 *Hits* com *score* significativo, porém, foram consideradas apenas as sequências que apresentaram *score* > 490 nas diferentes espécies de *Leishmania* como mostrado na Figura 1.A.

Para análise de similaridade da proteína LmxM.36.6760, foram consideradas as sequências que apresentaram e-value próximo a zero, identidade $\geq 93\%$ e cobertura de

100%, podemos observar na Figura 1.B, quatro sequências de proteínas hipotéticas conservadas presentes nas espécies de *Leishmania* atingiram a estes critérios (*Leishmania infantum*, *Leishmania major*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*), sugerindo que esta proteína é conservada entre estas espécies.

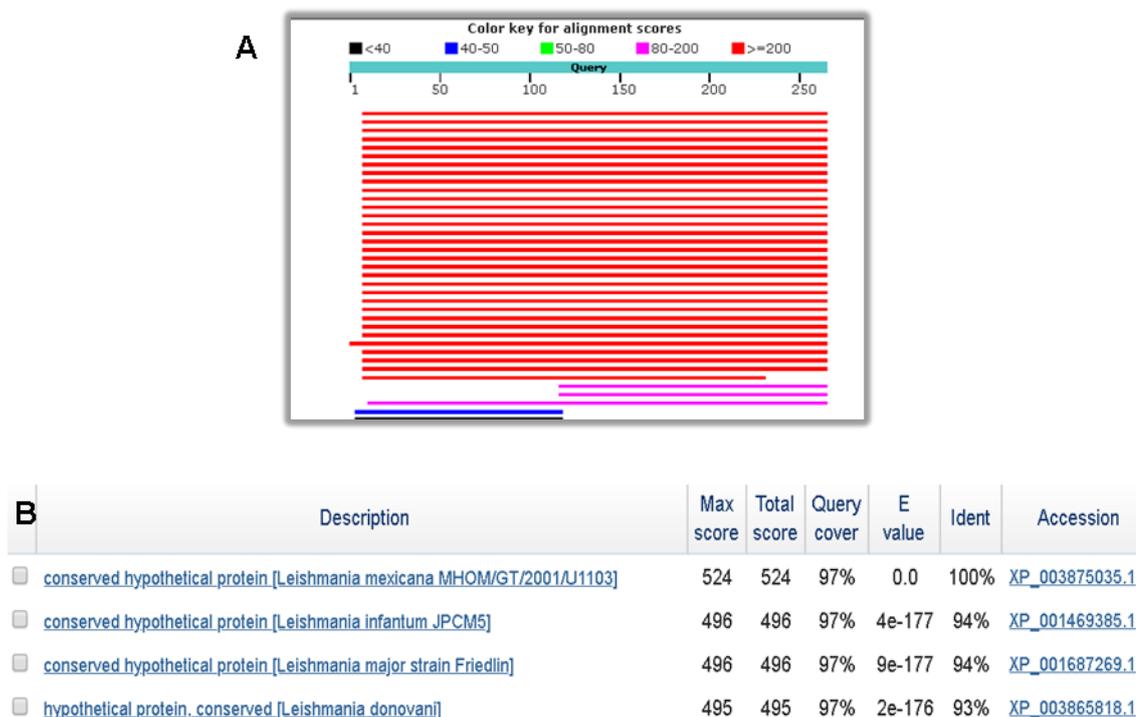


Figura 1. Alinhamento e similaridade da sequência da proteína LmxM.36.6760. (A) Alinhamento das sequências que apresentaram *score* > 490 nas diferentes espécies de *Leishmania*. (B) Similaridade das sequências que apresentaram e-value próximo a zero, identidade $\geq 93\%$ e cobertura de 100%.

Para a proteína LinJ.30.3360 foram obtidos 260 melhores *Hits* com *score* significativo, porém, foram consideradas apenas as sequências que apresentaram *score* > 681 como mostrado na Figura 2.A.

Na análise de Similaridade da proteína LinJ.30.3360, foram consideradas as sequências que obtiveram e-value próximo a zero, identidade $\geq 96\%$ e cobertura 100%. conforme representado na Figura 2.B, cinco sequências de proteínas hipotéticas conservadas presentes nas espécies de *Leishmania* alcançaram estes critérios, sugerindo que esta proteína é conservada entre as espécies: *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. braziliensis*. E há também sequência similar de uma proteína na espécie *Leptomonas pyrrocoris*. Estes são parasitos de artrópodes e podem ser encontrados em

outros organismos como nematóides, moluscos e anelídeos (McGhee e Cosgrove, 1980; Vickerman, 1994; Wallace, 1966).

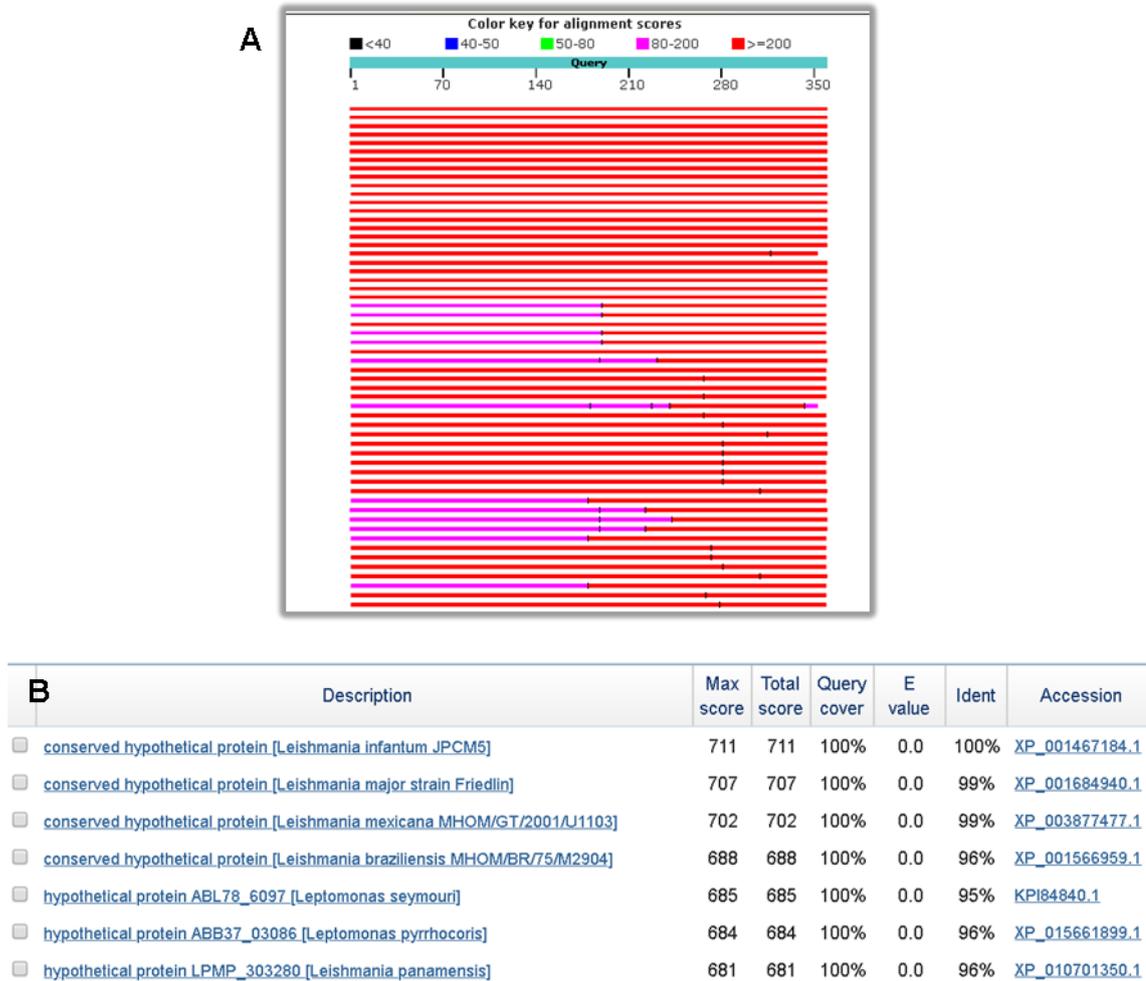


Figura 2. Alinhamento e similaridade da sequência da proteína LinJ.30.3360. (A) Alinhamento das sequências que apresentaram *score* > 681 nas diferentes espécies. (B) Similaridade das sequências que apresentaram e-value próximo à zero, identidade $\geq 96\%$ e cobertura de 100%.

Características físico-químicas (número de aminoácidos, massa molecular teórico e ponto isoelétrico) das proteínas foram preditos através da ferramenta ProtParam no servidor ExpASY (<https://www.expasy.org/>) e estão descritos na Tabela 2. No entanto, esses parâmetros estão sujeitos a alterações nas proteínas devido a modificações pós-traducionais e/ou durante o processamento para a realização dos experimentos. No trabalho de Pires *et al.*, 2014 essas proteínas foram identificadas após terem sido retiradas de 2-DE (gel bi-dimensional) onde foi registrado que apresentavam massa molecular e ponto isoelétricos experimentais diferentes dos teóricos. Para a proteína LmxM.36.6760 o PI

experimental foi de 5,04 e MM de 37 kDa enquanto para a LinJ.30.3360, o PI experimental foi de 5,46 e MM de 49 kDa.

Tabela 2. Características físico-químicas das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360.

Proteínas	Número de aminoácidos	Massa molecular teórica	Ponto isoelétrico
LmxM.36.6760	258	29.109 kDa	5.37
LinJ.30.3360	358	40.835 kDa	5.32

Também avaliamos a composição de aminoácidos das proteínas utilizando a ferramenta de predição ProtParam no servidor ExPASy (<https://www.expasy.org/>). Observamos que para a proteína LmxM.36.6760 o aminoácido valina está presente em maior quantidade, seguido da lisina, glutamato e alanina respectivamente. Podemos notar também, a presença de 36 resíduos de aminoácidos com carga negativa (aspartato e glutamato) e 33 resíduos com carga positiva (arginina e lisina) (Figura 3).

Para a proteína LinJ.30.3360, o aminoácido glicina se encontra em maior quantidade na composição geral de aminoácidos, seguido da tirosina, aspartato e lisina respectivamente. Foram encontrados 59 resíduos com carga negativa aspartato e glutamato) e 46 resíduos com carga positiva (arginina e lisina) (Figura 4).

Amino acid composition:

Ala (A)	21	8.1%
Arg (R)	11	4.3%
Asn (N)	7	2.7%
Asp (D)	14	5.4%
Cys (C)	1	0.4%
Gln (Q)	9	3.5%
Glu (E)	22	8.5%
Gly (G)	10	3.9%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	8	3.1%
Leu (L)	19	7.4%
Lys (K)	22	8.5%
Met (M)	5	1.9%
Phe (F)	14	5.4%
Pro (P)	14	5.4%
Ser (S)	15	5.8%
Thr (T)	19	7.4%
Trp (W)	3	1.2%
Tyr (Y)	11	4.3%
Val (V)	33	12.8%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 36

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 33

Figura 3. Composição de aminoácidos da proteína LmxM.36.6760, de acordo com o algoritmo ProtParam no servidor ExPASy (<https://www.expasy.org/>).

Amino acid composition:

CSV format

Ala (A)	11	3.1%
Arg (R)	21	5.9%
Asn (N)	16	4.5%
Asp (D)	32	8.9%
Cys (C)	6	1.7%
Gln (Q)	8	2.2%
Glu (E)	27	7.5%
Gly (G)	67	18.7%
His (H)	10	2.8%
Ile (I)	7	2.0%
Leu (L)	16	4.5%
Lys (K)	25	7.0%
Met (M)	6	1.7%
Phe (F)	5	1.4%
Pro (P)	5	1.4%
Ser (S)	10	2.8%
Thr (T)	18	5.0%
Trp (W)	15	4.2%
Tyr (Y)	37	10.3%
Val (V)	16	4.5%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 59

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 46

Figura 4. Composição de aminoácidos da proteína LinJ.30.3360, de acordo com o algoritmo ProtParam no servidor ExPASy (<https://www.expasy.org/>).

A fim de avaliarmos a presença de peptídeo sinal, hélice transmembrana, via secretora ou âncora GPI nas proteínas estudadas, utilizamos os banco de dados DTU *Bioinformatics* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) e a ferramenta PredGPI no servidor Biocomp.unibo (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/>). No entanto, tais análises não indicaram a presença de quaisquer das modificações citadas.

Para avaliarmos a presença de modificações pós-traducionais como a ubiquitinação, oxidação, glicosilação, fosforilação, metilação e acetilação das proteínas, utilizamos o banco de dados DTU *Bioinformatics* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>). Contudo as análises de ubiquitinação, oxidação, glicosilação, metilação e acetilação não indicaram a presença destas modificações, porém a predição de fosforilação indicou 23 sítios de fosforilação para proteína LmxM.36.6760 sendo considerado score significativo $\geq 0,500$ pode ser observado na Figura 5.A. Para proteína LinJ.30.3360 apresentou 19 sítios de fosforilação considerando também score significativo $\geq 0,500$ pode-se observar na Figura 5.B.

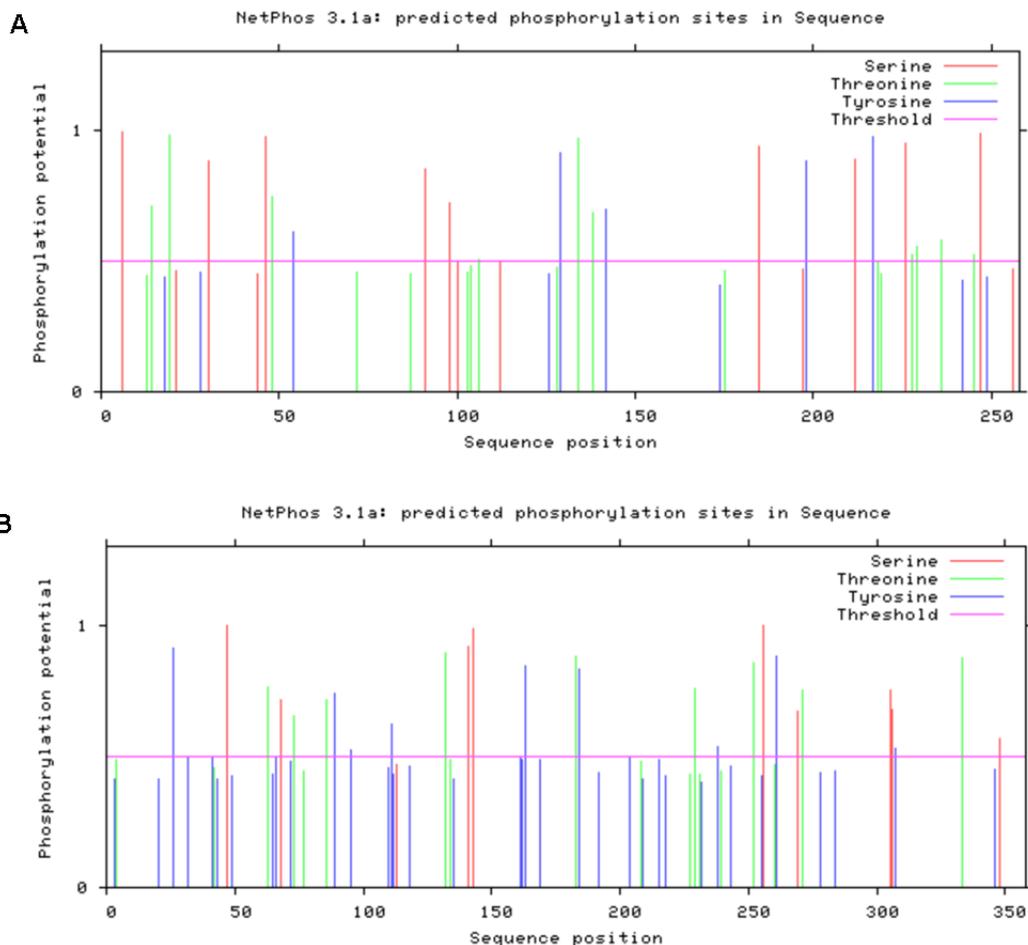


Figura 5. Predição de fosforilação. (A) Proteína LmxM.36.6760; (B) Proteína LinJ.30.3360, de acordo com a ferramenta NetPhos utilizando o banco de dados DTU *Bioinformatics* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>).

Realizamos também a predição de estrutura secundária das proteínas, através da ferramenta PSIPRED utilizando o servidor UCL *Department of computer Science* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Para a proteína LmxM.36.6760 verificou-se a composição principalmente de α -hélice na sua estrutura, como observado em rosa na Figura 6.A. Já a proteína LinJ.30.3360 é composta principalmente de folha- β como pode ser visto em amarelo na Figura 6.B.

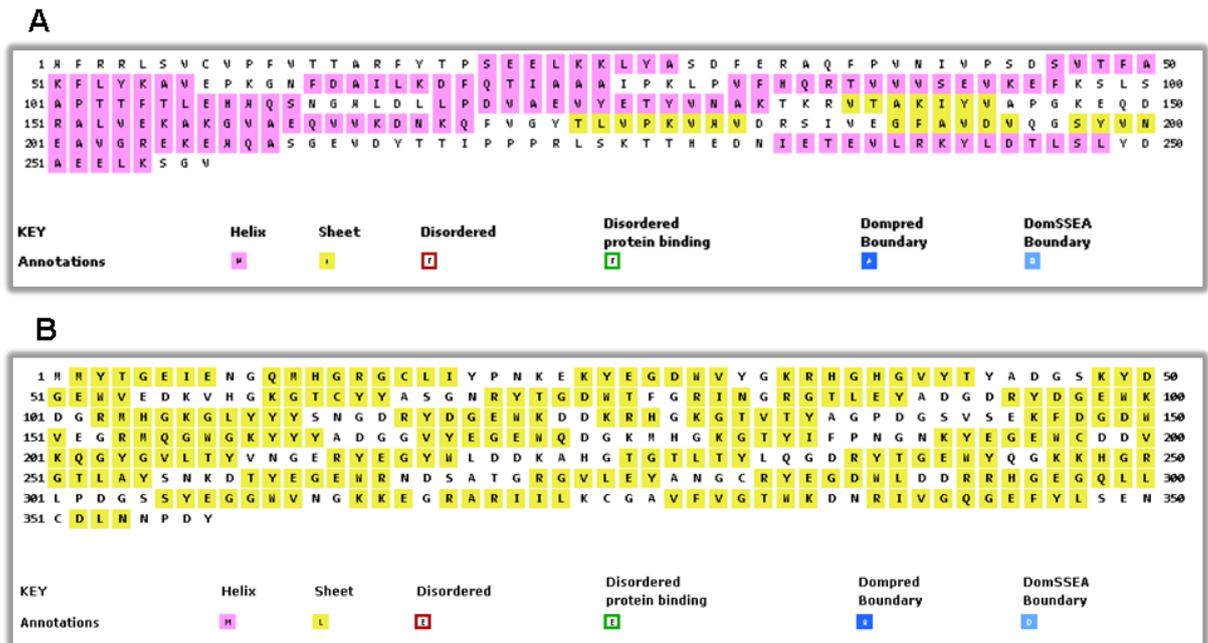


Figura 6. Predição da estrutura secundária. (A) Proteína LmxM.36.6760; (B) Proteína LinJ.30.3360, de acordo com a ferramenta PSIPRED utilizando o servidor UCL *Department of computer Science* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Legenda: Rosa α -hélice; Amarelo: Folha- β .

A predição de localização celular foi realizada através dos algoritmos DeepLoc-1.0, TargetP e Wolf PSORT. Para a proteína LmxM.36.6760, as análises indicaram localização mitocondrial, já para a proteína LinJ.30.3360 foi predita localização citoplasmática (Tabela 3).

Tabela 3. Predição de localização celular através dos algoritmos DeepLoc-1.0, TargetP e Wolf PSORT das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360.

Proteínas	DeepLoc-1.0	TargetP	WoLF PSORT
LmxM.36.6760	Mitocôndria	Mitocôndria	Mitocôndria
LinJ.30.3360	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma

5.2 Localização celular

5.2.1 Microscopia confocal

A localização celular utilizando a microscopia confocal foi realizada utilizando as formas promastigotas na fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* para a proteína LmxM.36.6760 e na espécie *L. infantum* para a proteína LinJ.30.3360. Após o preparo dos parasitos descrito no item (4.4.1), foram incubados com soros anti-LmxM.36.6760 e anti-LinJ.30.3360 em uma diluição 1:50 e foi utilizado o anti-KMP11 (*kinetoplastid membrane protein*) como controle de proteína de membrana, em uma diluição de 1:100 e anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com Alexa 555 (*Thermo Fisher Scientific*) para as proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 e o anti-mouse conjugado com Alexa488 (*Thermo Fisher Scientific*) para a proteína KMP11, em uma diluição de 1:500. Optamos pela utilização das imagens dos parasitos incubados com o soro anti-LmxM.36.6760 após a permeabilização devido a qualidade das imagens para visualização do resultado, este apresentou a proteína na membrana do parasito, sendo a mesma, co-localizada com a proteína KMP11 (proteína de membrana) (Figura 7). No entanto, este resultado foi divergente ao encontrado na predição de localização celular, que indicou possível localização mitocondrial de tal proteína (item 5.1).

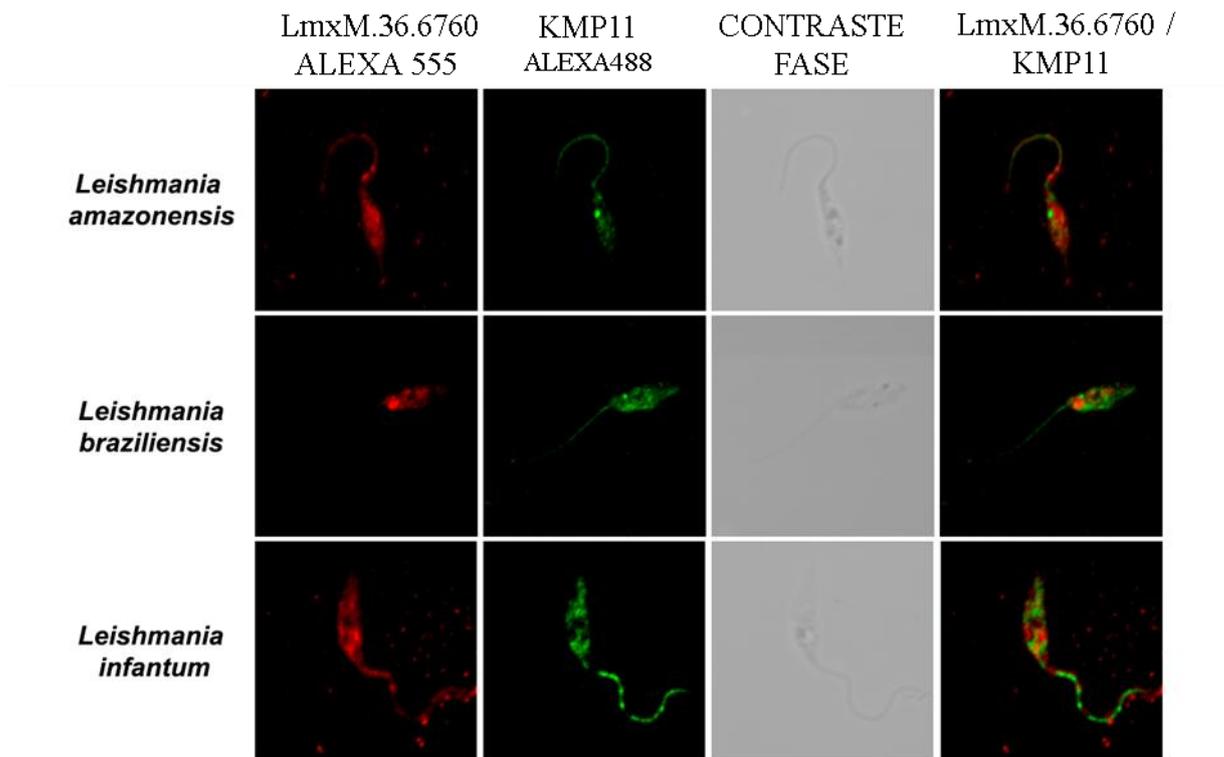


Figura 7. Localização celular da proteína LmxM.36.6760 nas formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Os Parasitos permeabilizados foram incubados com soro de coelho (anti-LmxM.36.6760) na diluição 1:50 e anti-KMP11 na diluição de 1:100. Foi usado anticorpo secundário anti-rabbit, conjugado com Alexa 555 (vermelho) para LmxM.36.6760 e o anti-mouse conjugado com Alexa488 (verde) para a proteína KMP11, em uma diluição de 1:500. Imagens obtidas com o Microscópio Confocal Zeiss LSM 880, objetiva (63x NA 1.4). NA = Número de abertura.

Para a proteína LinJ.30.3360 o resultado foi bem sucedido somente para espécie *Leishmania infantum* e este pode ser visto na Figura 8. As imagens mostram a presença dessa proteína também na membrana do parasito não permeabilizado, o que é confirmado através da co-localização com a proteína KMP11 (proteína de membrana). Porém, após a permeabilização a proteína LinJ.30.3360 se encontra pontilhada no citoplasma. Concordando com nossas análises de predição de localização celular, que identificou a proteína no citoplasma (item 5.1). Sendo necessário mais experimento para confirmar a localização desta proteína.

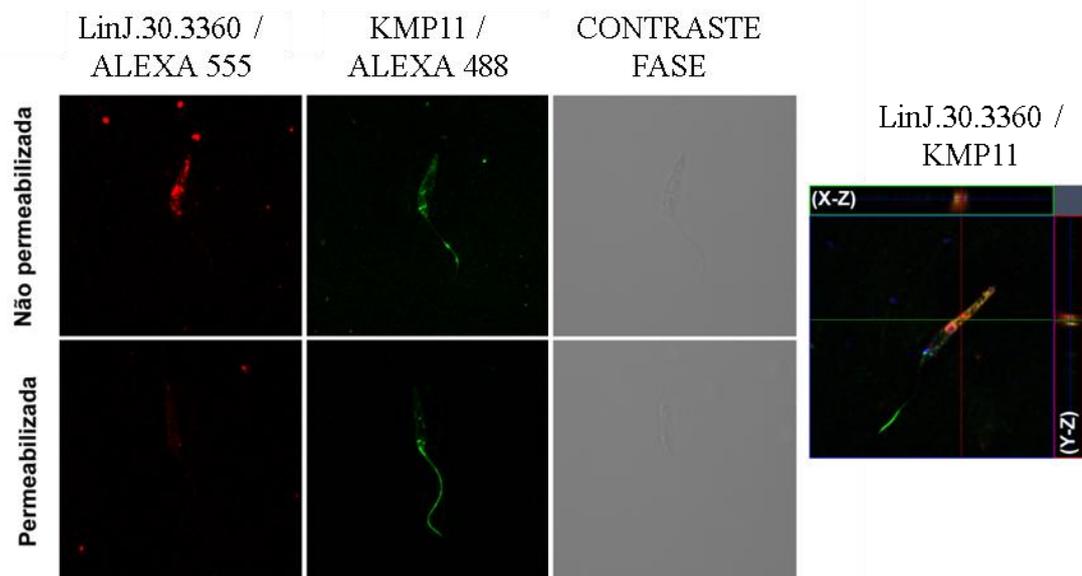


Figura 8. Localização celular de promastigotas de *L. infantum* para proteína LinJ.30.3360. Os Parasitos permeabilizados e não permeabilizados foram incubados com soro de coelho (anti-LinJ.30.3360) na diluição 1:50 e anti-KMP11 na diluição de 1:100. Foi usado anticorpo secundário anti-rabbit, conjugado com Alexa 555 (vermelho) para LinJ.30.3360 e o anti-mouse conjugado com Alexa488 (verde) para a proteína KMP11, em uma diluição de 1:500. Imagens obtidas com o Microscópio Confocal Zeiss LSM 880, objetiva (63x NA 1.4). NA = Número de abertura.

5.3 Avaliação da abundância das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 em diferentes espécies de *Leishmania*

5.3.1 Western blotting

Para verificarmos a abundância das proteínas alvo no nosso estudo nas diferentes espécies de *Leishmania*, foi realizado o ensaio de *Western Blotting* utilizando extratos proteicos de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Para isso, 40µg do extrato total de proteína das distintas espécies foram fracionados em gel SDS-PAGE 12%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Protran 0.45µm, NC 300mm×4m 1 roll) e a reação foi realizada conforme descrito no item 4.3.2.

Foram utilizados os anticorpos anti-LmxM.36.6760, anti- α -Tubulina (*Sigma-Aldrich*) e anti-LinJ.30.3360. A banda proteica reconhecida pelo anti- α -tubulina foi usada para a normalização do experimento e apresentou intensidade de sinal semelhante em *L. amazonensis* e *L. infantum* quando comparadas com o sinal da espécie *L. braziliensis* (Figura 9.A). Porém, após a quantificação da intensidade (em unidades arbitrárias), não foram observados diferenças estatísticas significativas entre as espécies (Figura 9.B).

Nas membranas que foram incubadas com anti-LinJ.30.3360, podemos verificar a presença de sinais fracos em *L. braziliensis* e *L. infantum* e a intensidade do sinal em *L. amazonensis* é aparentemente mais forte em comparação com as outras espécies (Figura 9.A). No entanto, após a quantificação da intensidade (em unidades arbitrárias), não foram observados diferenças estatísticas significativas entre as distintas espécies (Figura 9.B). Resultado semelhante foi também observado nas membranas incubadas com anti-LmxM.36.6760, onde a intensidade de sinal foi aparentemente semelhante em *L. braziliensis* e *L. infantum*, e discretamente mais intenso em *L. amazonensis* (Figura 9.A). Porém, novamente, não foi observada diferença estatística significativa após a quantificação dos sinais obtidos (Figura 9.B). A figura 9.C mostra os dados de intensidade após normalização com o controle.

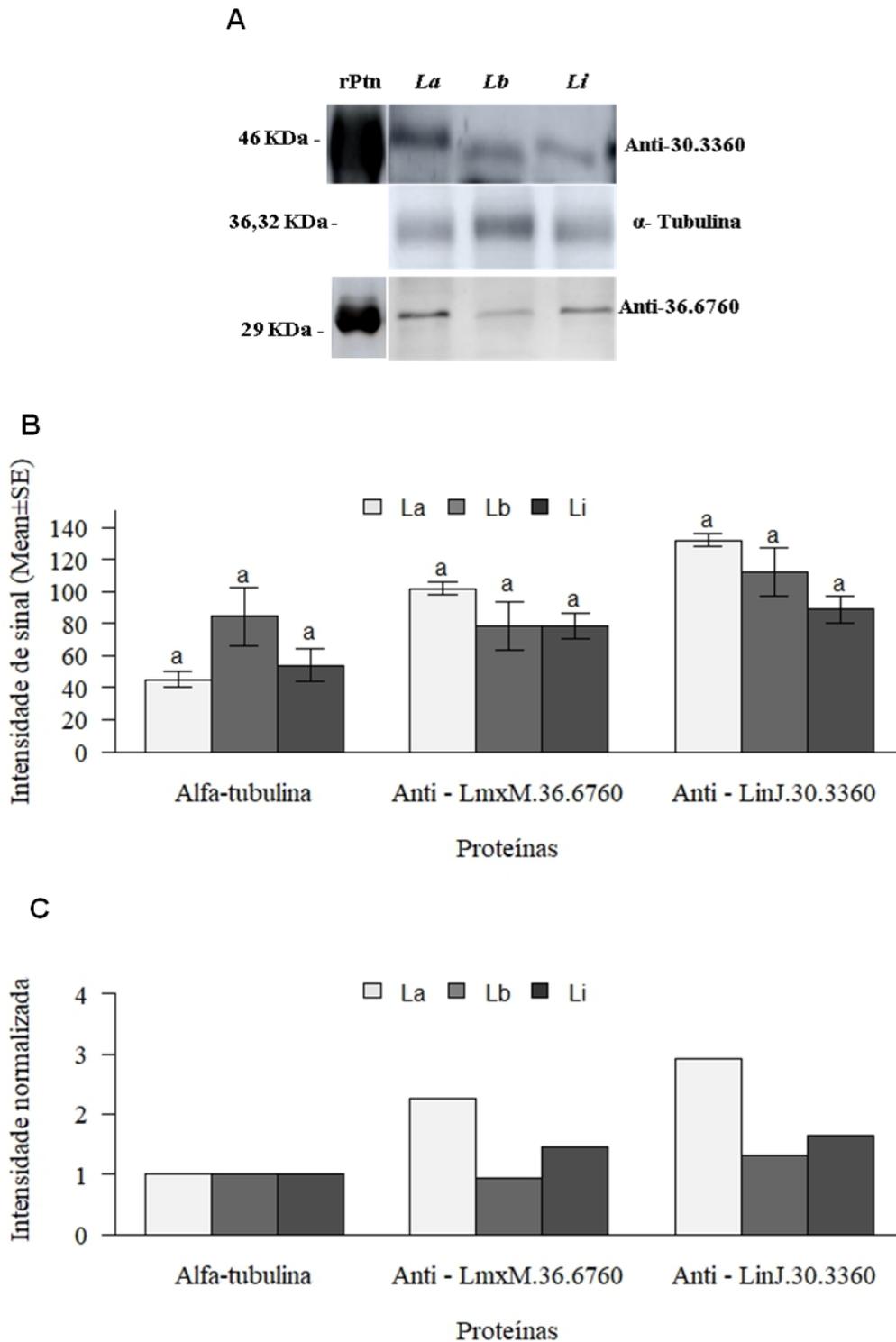


Figura 9. Avaliação da abundância das proteínas α -tubulina, LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 por *Western Blotting* em extratos proteicos de formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*: (A) Imagens do *Western blotting* obtidas, para a verificação da abundância das proteínas reveladas com anti-LmxM.36.6760, α -tubulina (normalizador) e anti-LinJ.30.3360; (B) Medição de intensidade dos sinais em unidades arbitrárias através do *software* ImageJ. (C) Medição de intensidade de sinais após normalização com a α -tubulina. rPtn = proteína recombinante; La = *Leishmania amazonensis*; Lb = *Leishmania braziliensis*; Li = *Leishmania infantum*.

6. DISCUSSÃO

Devido ao crescente avanço das tecnologias e estudos em larga escala, inúmeras questões sobre a biologia molecular e estudos genômicos dos organismos puderam ser esclarecidas. Dentro do contexto dos genomas dos tripanosomatídeos, o estudo de proteínas hipotéticas é de fundamental importância, uma vez que alguns organismos deste táxon, o qual pertence aqueles que são objetos de estudo neste trabalho, possuem aproximadamente 60% de seus proteomas preditos compostos por proteínas não caracterizadas. Esta situação é mantida atualmente, mesmo considerando a era das “ômicas”, uma vez que a maioria dos estudos focam em elementos dos organismos que já estão bem entendidos e estabelecidos no cenário molecular. Por isso, a oportunidade de expansão do conhecimento além do que é sabido torna-se um desafio à ciência (Pawłowski, 2008).

A predição da função provável de um gene/proteína é baseada primariamente em homologia de sequências (Smith, 1996; Claverie, 1997). Por meio dos estudos de similaridade de sequências, pode-se atribuir função a, aproximadamente, 60-70% das proteínas dos organismos mais estudados (Choi *et al.*, 2011; Doerks *et al.*, 2012; Qiao *et al.*, 2013).

No presente estudo, realizamos algumas predições através de análises de bioinformática. Nossa primeira abordagem foi à busca por similaridade em bancos de dados das sequências de espécies do mesmo gênero. Foi observado alta similaridade nas sequências das duas proteínas estudadas com outras depositadas nos bancos de dados das espécies *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, indicando que ambas são proteínas conservadas nessas espécies. De fato, análises comparativas dos genomas de diferentes espécies de *Leishmania* tem demonstrado sua alta sintonia, em torno de 98% (Peacock *et al.*, 2007). Essa alta similaridade entre espécies pode ter facilitado o uso dos soros (anticorpos policlonais) produzidos contra as formas recombinantes dessas proteínas (clonadas a partir da sequência de *L. infantum*) e utilizados nos ensaios de *western blotting* com extratos proteicos das outras espécies, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* para avaliarmos abundância. Foi possível verificar a presença em abundância similar de ambas as proteínas nas três espécies estudadas: *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Assim, as proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360, que em cepas de *L. infantum* mais virulenta (BH400) haviam apresentado aumento e diminuição de abundância, respectivamente, em relação a menos virulenta (BH46), apresentam mesmo

nível de abundância nas distintas espécies. Esse resultado entre espécies em contradição com o intra-específico foi surpreendente. Ao mesmo tempo a similaridade de sequência e de abundância dessas proteínas pode ser positiva para estudos de caracterização, função e uso. Por exemplo, se for demonstrado que podem ser bons alvos de droga, antígenos vacinais e/ou antígenos diagnóstico para uma espécie, podemos acreditar que tem chance de serem também para outras espécies. Outrossim, se confirmado o envolvimento destas proteínas na virulência do parasito.

No presente trabalho, também realizamos análises de predições de peptídeo sinal, domínio transmembrana ou âncora GPI. No entanto, as análises mostraram ausência desses sinais nas sequências das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360, sugerindo que estas não são exportadas. Gohil e colaboradores (2013) avaliaram novas sequências depositadas em células infectadas pelo protozoário *Babesia bovis*, através de predições de bioinformática. Para isto, utilizaram alguns critérios de seleção para identificação das proteínas potencialmente exportadas, como, a presença de peptídeo sinal, domínio transmembrana ou âncora de GPI foram consideradas. Utilizando estes preditores, 362 proteínas foram identificadas, dentre estas, 214 foram consideradas proteínas exportadas. Para validação destes resultados, cinco proteínas da lista de 214 foram selecionadas e realizado experimento de fluorescência indireta, que demonstrou que uma dessas proteínas é exportada (Gohil, S. *et al.* 2013).

As predições de modificações pós-traducionais mostraram ausência desses sinais nas sequências das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360, porém, as análises de fosforilação indicaram vinte e três sítios de fosforilação para proteína LmxM.36.6760 e dezenove sítios para proteína LinJ.30.3360. A fosforilação de proteínas modula a função proteica em organismos em todos os níveis de complexidade. Parasitos do gênero *Leishmania* sofrem várias transições de desenvolvimento em seu ciclo de vida, desencadeadas pelo ambiente externo. Os mecanismos moleculares que esses organismos usam para processar e integrar essas pressões externas são em grande parte desconhecidos (Palmeri *et al.* 2011).

A predição de localização celular utilizando os algoritmos TargetP, DeepLoc-1.0 e WoLF PSORT, mostrou que os resultados obtidos entre os programas foram similares para ambas as proteínas estudadas: LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 indicando a primeira com localização na mitocôndria e a segunda no citoplasma. Inicialmente, o TargetP foi criado para predição da localização de proteínas de plantas e atualmente está sendo utilizado para eucariotos. O programa baseia-se na porção N-terminal da sequência proteica e separa

entre proteínas destinadas à mitocôndria, ao cloroplasto e à via secretória (Emanuelsson *et al.*, 2000). Já o WoLF PSORT, converte a localização de aminoácidos em vetores numéricos buscando peptídeos sinais, composição de aminoácidos e motivos funcionais. Sua característica é fornecer diversas localizações, entre elas: núcleo, mitocôndria, citosol e membrana plasmática (Horton *et al.*, 2007). O DeepLoc é um acervo de proteínas com informações confiáveis de localização subcelular, este, prevê a localização subcelular de proteínas eucarióticas, podendo diferenciar entre dez diferentes localizações: núcleo, citoplasma, extracelular, mitocôndria, membrana celular, retículo endoplasmático, cloroplasto, aparelho de golgi, lisossoma / vacúolo e peroxissoma. Este modelo supera algoritmos atuais de última geração, mesmo aqueles que confiam em informações de homologia (Almagro Armenteros *et al.*, 2017).

Brito, 2014, identificou novos antígenos candidatos vacinais contra leishmaniose visceral canina no genoma de *L. infantum*, utilizando diversas análises de bioinformática, entre elas, a predição de localização celular de proteínas, através dos algoritmos: WoLF PSORT, TargetP e Sigcleave. O algoritmo TargetP realizou 894 predições de proteínas secretadas, enquanto que os algoritmos Sigcleave e WoLF PSORT realizaram 1983 e 2020 predições respectivamente, entre proteínas secretadas e vinculados a membrana plasmática (Brito, 2014). Demonstrando assim que o algoritmo WoLF PSORT é mais abrangente que os demais.

Resende e colaboradores (2012) avaliaram métodos de predição de epítomos candidatos vacinais contra leishmaniose, entre as predições analisadas utilizando os algoritmos: WoLF PSORT, TargetP e Sigcleave, estes previram a localização celular e os resultados mostraram que os algoritmos foram capazes de fazer a predição correta da localização das proteínas de tripanosomatídeos. Novamente, o software WoLF PSORT foi o que apresentou os melhores índices de acurácia e especificidade (Resende *et al.*, 2012).

Para a complementação dos estudos de caracterização de proteínas podemos utilizar ainda as análises bioquímicas, estrutural, enzimática, molecular, funcional e imunomarcção para localização celular.

Dessa forma, a fim de validarmos os dados de predição da localização celular, realizamos ensaios de microscopia confocal, utilizando soro de coelho imunizado com as proteínas recombinantes rLmxM.36.6760 e rLinJ.30.3360. Estes experimentos indicaram que as referidas proteínas localizam-se na membrana e em pequena concentração no citoplasma do parasito, respectivamente, para a proteína LmxM.36.6760 nas espécies:

Leishmania amazonensis, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* e para a proteína LinJ.30.3360 na espécie *Leishmania infantum*. Estes resultados mostraram-se discordantes com as análises *in silico* de predição da localização celular. As análises “*in silico*” são na maioria das vezes de predição e necessitam de experimentos para a real comprovação. Defendemos que os dados experimentais não podem ser superados pelas predições. No entanto, as predições de endereçamento, como presença de peptídeo sinal, domínio transmembrana e âncora GPI, das proteínas estudadas também não indicaram localização em membrana. Por tudo isso, acreditamos que análises adicionais devem ser realizadas para confirmação deste resultado, como por exemplo, a microscopia eletrônica de transmissão, utilizando anticorpo conjugado a partículas de ouro. Estes ensaios já estão em andamento, na fase de padronização das melhores condições experimentais para as diferentes espécies.

Shrestha e colaboradores (2017) em um trabalho de localização celular da proteína CSUI_005805 específica de merozoíto do protozoário *Cystoisospora suis*, utilizaram a técnica de imunolocalização através da microscopia confocal. Os autores observaram que esta proteína está presente no complexo da membrana interna, corroborando os achados nas análises *in silico* que previram a presença de peptídeo sinal e domínios transmembrana, sugerindo que esta proteína pode ser sintetizada como proteína madura no citosol e depois transportada para a membrana externa (Shrestha *et al.* 2017).

De forma semelhante, Schneider e colaboradores em 2004 realizaram estudos de predição de localização celular da proteína TaD (domínio de associação topológica) do parasito *Theileria annulata* através do algoritmo TargetP. As análises revelaram que a referida proteína localiza-se na membrana do parasito. A fim de validar esta predição, foram realizados experimentos de imunomarcagem através da técnica de microscopia confocal. As imagens mostraram que a proteína em questão apresentou localização celular predominantemente no citoplasma. Os autores também observaram a presença da proteína TaD na membrana do parasito, validando os resultado da predição de localização celular (Schneider *et al.* 2004).

Também Jardim e colaboradores (2002) realizaram a caracterização molecular, bioquímica e imunocitoquímica de uma proteína peroxissômica 14 (PEX14) de *L. donovani*. Entre as diversas análises, eles utilizaram a microscopia confocal para avaliar a localização celular desta proteína e observaram sua presença na membrana do parasito,

validando o resultado obtido nas análises de predição de localização celular, que revelaram a presença de um domínio transmembrana (Jardim *et al.* 2002).

Durante o presente estudo, as proteínas alvo no nosso trabalho, foram reanotadas no banco de dados TritypDB (*The Kinetoplastid Genomics Resource*). A proteína LmxM.36.6760 foi, anteriormente, anotada como uma proteína hipotética conservada de *Leishmania mexicana*. Após a reanotação, a encontramos como uma provável subunidade de ATP synthase delta OSCP (*Oligomycin Sensitivity Conferral Protein*): proteína que confere sensibilidade à oligomicina e está associada à membrana mitocondrial para a síntese de ATP (Carbajo *et al.* 2005). Após busca no banco de dados UniProtKB, foram encontrados diversos organismos que expressam essa proteína, dentre estes estão os protozoários *Plasmodium yoelii yoelii*, *Plasmodium vivax* e *Babesia bovis*. Panigrahi e colaboradores em 2009 realizaram uma análise do proteoma mitocondrial de *Trypanosoma brucei* através da espectrometria de massa e identificaram 2.897 proteínas, sendo 283 atribuídos à mitocôndria. Dentre estas proteínas está a ATP synthase delta (OSCP) subunit. Assim, esses dados da literatura, são indicativos de que os resultados das nossas análises de predição da localização celular para proteína LmxM.36.6760 estão coerentes e, que a referida proteína apresente localização mitocondrial.

Com relação à proteína LinJ.30.3360, ela foi, anteriormente, anotada como uma proteína hipotética de *Leishmania infatum*, e após a nova anotação encontra-se descrita como uma MORN repeat-containing protein 1. A função precisa dos domínios MORN ainda não foi esclarecida, mas sua localização pode ser variada entre os diferentes organismos. Tem sido relatado que as MORNs ligam-se à membrana plasmática em células de plantas (Ma *et al.*, 2006); foram encontradas no tecido de testículos humanos (Choi *et al.*, 2010); no complexo basal em *Toxoplasma gondii* (Gubbels *et al.*, 2006) e na estrutura bilobular de *Trypanosoma brucei* (Morriswood *et al.*, 2009).

Também Gubbels e colaboradores (2006) identificaram em *Toxoplasma gondii* duas proteínas MORN. A MORN1 é altamente conservada entre os parasitos do filo apicomplexa e está associada a várias estruturas que desempenham papel na divisão celular. Após a superexpressão da proteína MORN1 eles observaram uma má formação nas células filhas, confirmando o seu papel na divisão celular.

Nos cinetoplastídeos, a MORN1 é bem caracterizada em *T. brucei*. Morriswood e colaboradores (2009) descobriram TbMORN1 como um componente da estrutura bilobular em *T. brucei*, que faz parte do citoesqueleto de flagelos e fica nas proximidades da bolsa

flagelar. Após o silenciamento de TbMORN1, produziram-se defeitos de crescimento nas células procíclicas e a perda de TbMORN1 nas formas sanguínea foi letal, indicando tratar-se de um gene essencial (Morriswood *et al.*, 2009). Nossas análises de predição da localização celular para a proteína LinJ.30.3360 indicaram uma localização citoplasmática, no entanto, os experimentos de imunolocalização, não foram conclusivos quanto a localização específica desta proteína. Como verificamos na literatura e através das novas anotações depositadas para essa sequência, trata-se de uma proteína com localização variada entre os organismos. Assim, serão necessários novos experimentos de localização celular que possam revelar resultados de forma mais conclusiva.

7. CONCLUSÕES

Foram encontradas sequências similares as das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 nas espécies *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana* e *L. infantum*, e estas não apresentam peptídeo sinal, domínio transmembrana ou âncora GPI. A estrutura secundária predita para LmxM.36.6760 é de alfa-hélice enquanto para a proteína LinJ.30.3360 é de folha-beta.

Observamos similaridade dos resultados obtidos entre os três preditores de localização celular: TargetP, WOLF PSORT e DeepLoc-1.0, que indicaram localização na mitocôndria para proteína LmxM.36.6760 e localização no citoplasma do parasito para proteína LinJ.30.3360.

Os resultados de microscopia confocal mostraram-se inconclusivos quanto a localização celular das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360, sendo necessária a realização de experimento mais sensível a fim de determinarmos a real localização dessas proteínas em *Leishmania*.

As proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 apresentam abundância similar entre as espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Lewis, J., Raff, M.C. 2010. *Biologia molecular da célula*. 5ª ed. Porto Alegre: *Artmed*.
- Almagro, J.A., Sønderby, C.K., Sønderby, S.K., Nielsen, H. & Winther, O. 2017. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*; 33(21):3387–95.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, 215(3):403-10.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.*;7(5).
- Anderson, L., Seilhamer, J.A. 1997. Comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, v.18, p.533–7.
- Arnaud, M.B., Costanzo.M.C. 2005. The Candida Genome Database (CGD), a community resource for *Candida albicans* gene and protein information, *Nucleic Acids Research*, 33, D358-D363.
- Ashford, R.W. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.*; 30(12-13):1269–81.
- Basano, S.A., Camargo, L.M.A. 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. bras. Epidemiol*, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, Sept.
- Bates, P.A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 37(10):1097–106.
- Berman, J.D. 2005. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep* 7:33-38.
- Branden, C. & Tooze, J. 1999. Introduction to protein structure 2nd edition. *Garland Publishing*. Inc., 19 Union Square West, new York, NY 10003-3382.
- Brito, Rory Cristiane Fortes de. Identificação de novos antígenos candidatos vacinais contra leishmaniose visceral canina no genoma de *L. infantum* utilizando a bioinformática como ferramenta. 2014. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.
- Carbajo, R.J., Kellas, F.A., Runswick, M.J., Montgomery, M.G., Walker, J.E. and Neuhaus, D. 2005. Structure of the F1-binding domain of the stator of bovine F1Fo-ATPase and how it binds an α -subunit. *J. Mol. Biol.* 351, 824–838.

- Castellucci, L.C., Almeida, L.F., Jamieson, S.E., Fakiola, M., Carvalho, E.M., Blackwell, J.M. 2014. Host genetic factors in American cutaneous leishmaniasis: a critical appraisal of studies conducted in an endemic area of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 109, n. 3, p. 279-288, May.
- Choi, C.M., Lerner, E.A. 2001. Leishmaniasis as an Emerging Infection. *J Investig Dermatol Symp Proc* 6(3): 175-82.
- Choi, Y. J., Hwang, K. C., Park, J. Y., Park, K. K., Kim, J. H., Parks, S. B., Hwang, S., Park, H. & Park, C. 2010. Identification and characterization of a novel mouse and human MOPT gene containing MORN-motif protein in testis. *Theriogenology*, 73, 273-81.
- Choi, S. B., Normi, Y. M., Wahab, H. A. 2011. Revealing the functionality of hypothetical protein KPN00728 from *Klebsiella pneumoniae* MGH78578: molecular dynamics simulation approaches. *BMC Bioinformatics*, 12 (Suppl 13):S11.
- Claverie, J. M. 1997. Computational methods for the identification of genes in vertebrate genomic sequences. *Hum. Mol. Genet*, 6, 1735–1744.
- Clayton, C.E. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again *Embo J*, v.21 p.1881–8.
- Costa, C.H.N., *et al.* 2007. Kala-azar is a slow-motion systemic inflammatory response syndrome: lessons from death. In: *International congress of immunology*, Rio de Janeiro, v. 13, p: 21-25, Aug.
- Costa, C.H.N., Vieira J.B.F. 2001. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 34, n. 2, p: 34:223-228, mar/abr.
- Costa, M.M., Andrade, H.M., Bartholomeu, D.C., Freitas, L.M., Pires, S.F., Chapeaurouge, A.D., Perales, J., Ferreira, A.T., Giusta, M.S., Melo, M.N., Gazzinelli, R.T. 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.
- Crawley, M. J. 2013. The R book. Wiley, Chichester, West Sussex, United Kingdom.
- Dantas-Torres, F., Brandão-Filho, S.P. 2006. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39(4):352–6.
- de Azevedo, W.F. & Soares, M.B. 2009. Selection of targets for drug development against protozoan parasites. *Curr. Drug Targets* 10, 193-201.

- De Oliveira, C.I, Teixeira, M.J, Gomes, R., Barral, A., Brodskyn, C. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Dis Today: Dis Mod.* 2004;1:81–6.
- Desjeux, P. 1996. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin Dermatol.*, v. 14, p. 417-423.
- Desjeux, P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v. 95(3), p. 239-243.
- Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 27(5):305–18.
- Desler, C., Suravajhala, P., Sanderhoff, M., Rasmussen, M., Rasmussen, L. J. 2009. *In Silico* screening for functional candidates amongst hypothetical proteins. *BMC Bioinformatics*, 10:289.
- Doerks, T., Noort, V., Minguéz, P., Bork, P. 2012. Annotation of the *M. Tuberculosis* Hypothetical Orfeome: Adding Functional Information to More than Half of the Uncharacterized Proteins. *PLoS ONE* , 4: e34302.
- Doolittle, R. 1996. Of URFs and ORFS: A primer on how to analyze derived amino acid sequences. *University Science Books.*, Mill Valley, CA.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., Heijne, G., Nielsen, H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc*, 2:953-71.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300, 1005–1016. 2000.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., Heijne, G.V. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300: 1005-1016.
- Figueiro, F., Ernesto A. *et al.* 2005. Leishmaniose visceral e gestação: relato de caso. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, p: 92-97, Feb.
- Gohil, S., Kats, L.M., Seemann, T., Fernandez, K.M., Siddiqui, G., & Cooke, B.M. 2013. Bioinformatic prediction of the exportome of *Babesia bovis* and identification of novel proteins in parasite-infected red blood cells. *Int J Parasitol* 43: 409–416.
- Gontijo, B., Carvalho, M.L.R.. 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba , v. 36, n. 1, p. 71-80, Jan.

- Gossage, S.M., Rogers, M.E., Bates, P.A. 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol.* 33(10):1027-1034.
- Gramiccia, M., Gradoni, L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35, 1169-1180.
- Gubbels, M. J, Vaishnava, S., Boot, N., Dubremetz, J. F, Striepen. B. 2006. A MORN-repeat protein is a dynamic component of the *Toxoplasma gondii* cell division apparatus. *J Cell Sci.* 119: 2236–2245.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Sebersold, R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, v.19, p.1720–30.
- Haile, S., Papadopoulou, B. 2007. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology, Growth and Development.* v. 10, n. 6, p. 569–577.
- Horton, P., Park, K.J, Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J, Nakai, K. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35: W585–W587.
- Jardim, A., Rager, N., Liu, W., Ullman, B., Peroxisomal targeting protein 14 (PEX14) from *Leishmania donovani*. Molecular, biochemical, and immunocytochemical characterization, *Mol. Biochem. Parasitol.* 124 (2002) 51–62.
- Jensen, O.N. 2006. Interpreting the protein language using proteomics. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, v.7.
- Kaye, P., Scott, P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology* 9: 604-615.
- Kolker, E., Makarova, K.S., Shabalina, S., Picone, A.F., Purvine, S., Holzman, T., Cherny, T., Armbruster, D., Munson, R.S., Jr, Kolesov, G. 2004. Identification and functional analysis of 'hypothetical' genes expressed in *Haemophilus influenzae*., *Nucleic Acids Research*, 32, 2353-2361.
- Koonin, E.V., Galperin, M.Y. 2002. Sequence-Evolution-Function. Computational Approaches in *Comparative Genomics*. Kluwer Academic, Boston, MA.
- Laffitte, M.N., Leprohon, P., Papadopoulou, B., Ouellette, M. 2016. Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000 Research*, v. 5.

- Lainson, R., Shaw, J.J. 1987. Evolution, classification and geographic distribution. W Peters, R Killick-Kendrick editors, *The Leishmaniases in Biology and Medicine*. Academic Press, London. p. 1-120.
- Ma, H., Lou, Y., Lin, W. H. & Xue, H. W. 2006. MORN motifs in plant PIPKs are involved in the regulation of subcellular localization and phospholipid binding. *Cell Res*, 16, 466-78.
- Ministério da Saúde, 2010. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 180 p. : il.
- Ministério da Saúde, 2014. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 120 p.: il.
- Ministério da Saúde, 2015. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV. rev. e ampl.* Brasília : Ministério da Saúde. 109 p. : il.
- Ministério da Saúde. 2007. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2. ed. atualizada. Brasília: Ed.MS, 180 p.
- Mishra, M., Biswas, U.K., Jha, A.M., Khan, A.B. 1994. Amphotericin versus sodium stibogluconate in *first-line treatment of Indian kala-azar*. *Lancet*, v. 344, n. 8937, p:1599-1600.
- Morriswood, B., He, C.Y, Sealey-Cardona, M., Yelinek, J., Pypaert, M., Warren, G. 2009. The bilobe structure of *Trypanosoma brucei* contains a MORN-repeat protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 167:95–103.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2002. *Livro Lehninger - Princípios de Bioquímica*. 6 ed. Pdf.
- Ouzounis, C.A. e Karp, P.D. 2002. The past, present and future of genome-wide re-annotation., *Genome Biology*, 3.
- Paape, D., Aebischer, T. 2011. Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. *Journal of Proteomics*.P.1614-1624.

- Palmeri, A., Gherardini, P.F, Tsigankov, P., Ausiello, G., Späth G.F., Zilberstein, D., Helmer-Citterich, M. 2011. PhosTryp: a phosphorylation site predictor specific for parasitic protozoa of the family trypanosomatidae. *BMC Genomics*, 12, p. 614.
- Panigrahi, A.K, Ogata, Y., Zikova, A., Anupama, A., Dalley, R.A, Acestor, N., Myler, P.J, Stuart, K.D. A comprehensive analysis of *Trypanosoma brucei* mitochondrial proteome.
- Papadopoulou, B., Huang, X., Boucher, N., Mcnicoll, F. 2003. Stage-Specific Regulation of Gene Expression in *Leishmania*. *ASM News*, v. 69, p. 282–88.
- Pawłowski, K. Uncharacterized/hypothetical proteins in biomedical ‘omics’ experiments: is novelty being swept under the carpet? *Briefings in functional genomics & proteomics*, v. 7, n. 4, p. 283---290, 2008. ISSN 2041-2649. *Proteomics* (2009) 9:434–450.
- Peacock, C.S, Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C. *et al.* 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause human disease. *Nat Genet.* 39(7): 839-847.
- Peters, N.C., Egen J.G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M.P., Germain, R.N., Sacks, D. 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. August 15; 321(5891): 970–974. doi:10.1126/science.1159194.
- Pires, S.F., Fialho Jr, L.C., Silva, S.O., Melo, M.N., Souza, C.C., Tafuri, W.L., Romero, O.B., Andrade, H.M., 2014. Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach. *J. Proteome Res.* 13 (4), 1860–1872.
- Punta., M., Coggill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., Bateman, A., Finn., R. D. (2012). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, 40:D290-301.
- Qiao, J., Shao, M., Chen, L., Wang, J., Wu, G., Tian, X., Liu, J., Huang, S., Zhang, W. 2013. Systematic characterization of hypothetical proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals proteins functionally relevant to stress responses. *Gene*, 1:6-15.
- R Development Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 2015.
- Resende, D. M., Rezende, A.M., Oliveira, N.J., Batista, I.C, Corrêa-Oliveira, R., Reis, A.B., *et al.* 2012. An assessment on epitope prediction methods for protozoa genomes.

- BMC Bioinformatics*, v. 13, p. 309. ISSN 1471-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170965> >, acesso em 05 de fevereiro 2019.
- Rogic, S., A. K. Mackworth, & Ouellette, F. B. F. 2001. Evaluation of gene-finding programs on mammalian sequences., *Genome Research*, 11, 817-832.
- Rosenzweig, D., Smith, D., Opperdoes, F., Stern, S., Olafson, R.W., Zilberstein, D. Retooling 2008 *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *The FASEB Journal*, v.22.
- Ross, R. 1903 (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. (2) Further notes on Leishman's bodies. *Brit Med J*.2(2237):1261.
- Saravia, N.G.L., Valderrama, M., Labrada, A.F., Holguín, C., Navas, G., Palma, A. 1989. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in new World leishmaniasis. *J Infect Dis*. 159:725-735.
- Schneider, I., Haller, D., Seitzer, U., Beyer, D., Ahmed, J.S. 2004. Molecular genetic characterization and subcellular localization of a putative *Theileria annulata* membrane protein. *Parasitol Res* 94:405–415.
- Secundino, N.F.C, Eger, M. I., Braga, E.M., Santoro, M.M, Pimenta, P.F.P. 2005. *Lutzomyia longipalpis* Peritrophic Matrix: Formation, Structure, and Chemical Composition. *J Med Entomol*. 42(6): 928-938.
- Serafim, T.D, Coutinho-Abreu, I.V, Oliveira, F., Meneses, C., Kamhawi, S., & Valenzuela, J.G. 2018. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature Microbiology*. Volume 3, pages 548–555.
- Sharman, U., Singh, S. 2008. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, v. 45, p. 255–272, Dec.
- Shrestha, A., Palmieri, N, Abd-Elfattah, A., Ruttkowski, B., Pagès, M., Joachim, A. Cloning, expression and molecular characterization of a *Cystoisospora suis* specific uncharacterized merozoite protein. *Parasit Vectors*. 2017;10:68.
- Silveira, F.T., Lainson, R., Corbett, C. 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(3): 239-251.

Smith, D.F, Peacock, C.S, Cruz, A.K. 2007. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Inter. J. Parasitol.* 37, 1173-1186.

Smith, R.F. (1996). Perspectives: sequence data base searching in the era of large-scale genomic sequencing. *Genome Res*, 6, 653–660.

Tavora, L.G.F., Nogueira, M.B., Gomes, S.T. 2015. Visceral Leishmaniasis/HIV co-infection in northeast Brazil: evaluation of outcome. *Braz J Infect Dis*, Salvador, v. 19, n. 6, p: 651-656, Dec.

Werneck, G. L., Farias, T.J.C., Farias, G.C., Silva, F.O., Chaves, F.C., Gouvêa, M.V., Costa, C.H.N., Carvalho, F.A. 2008. Assessment of the effectiveness of control strategies for visceral leishmaniasis in the city of Teresina, State of Piauí, Brazil: baseline survey results - 2004. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v. 17, n. 2, p. 87-96, jun.

Westenberger, S.J., Cerqueira G.C., El-Sayded N.M., Zingales B., Campvell D.A., Sturm N.R. 2006. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. *BMC genomics*, v. 7, p. 60.

WHO. 1990. Control of the Leishmaniasis. Geneva, WHO, (Technical Report Series 703) 158p.

WHO. 2010. Library Cataloguing-in-Publication Data: Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March.

WHO. 2018. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>> acesso em 24 de Novembro de 2018.