

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia**

**Tese de Doutorado**

**Identificação de proteínas diferencialmente  
expressas em *Leishmania amazonensis*  
relacionadas com a diminuição da  
infeciosidade dos parasitas**

Aluno: Rubens Daniel Miserani Magalhães  
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem

Co-Orientadores: Prof. Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares  
Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Belo Horizonte  
2014

Rubens Daniel Miserani Magalhães

**Identificação de proteínas diferencialmente expressas em *Leishmania amazonensis* relacionadas com a diminuição da infecciosidade dos parasitas**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem

Co-Orientadores: Prof. Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares  
Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

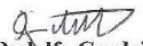
Belo Horizonte  
2014



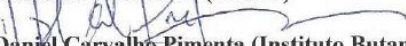
Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha  
 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



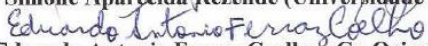
**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE RUBENS DANIEL MISERANI MAGALHÃES.** Aos dezoito dias do mês de julho de 2014 às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Identificação de proteínas diferencialmente expressas em *Leishmania amazonensis* relacionadas com a diminuição da infectividade dos parasitas", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Maria Norma Melo (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Daniel Carvalho Pimenta (Instituto Butantan), aprovado; Dra. Simone Aparecida Rezende (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovado; Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho - Co-Orientador (COLTEC), aprovado; Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares - Co-Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 18 de julho de 2014.

  
 Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (UFMG)

  
 Dra. Maria Norma Melo (UFMG)

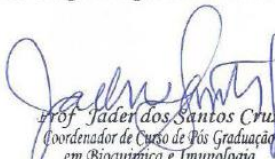
  
 Dr. Daniel Carvalho Pimenta (Instituto Butantan)

  
 Dra. Simone Aparecida Rezende (Universidade Federal de Ouro Preto)

  
 Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho - Co-Orientador (COLTEC)

Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares - Co-Orientador (UFMG)

  
 Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem - Orientador (UFMG)

  
 Prof. Jader dos Santos Cruz  
 Coordenador de Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

## Agradecimento especial ou dedicatória

Aos meus país e a minha avó pelo amor de uma vida...

À minha companheira Eliciane pelo amor de quase uma vida...

A Deus pelo amor da eternidade.

Dedico essa tese a Maria Madalena Cevolani Mattos (in memoriam), uma grande mulher:

“Que nos ensinou diariamente que a vida é feita de força, luta, persistência e FÉ!”,  
palavras de Eliciane C. Mattos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por ter me dado momentos de grande aprendizado nesses últimos quatro anos e me sustentado principalmente por meio de pessoas especiais, quando as forças faltaram.

Agradeço a meus pais Manoel A. Magalhães e Daisy M. M. Magalhães pelo apoio, a minha avó Teresinha Gladys M. Magalhães pelo carinho, à minha namorada, amiga e companheira Eliciane C. Mattos, pela ajuda. Ao meu orientador Dr. Ronaldo A. P. Nagem pela amizade, ensinamentos científicos e pessoais, aos meus coorientadores Dr. Eduardo A. F. Coelho e Dr. Carlos Alberto Tavares por terem me dado a oportunidade de realizar esse trabalho, e à Dra. Maria Júlia Manso Alves pela amizade, confiança e apoio.

Também agradeço a todos os meus companheiros de laboratório, a todos os membros do BIOEST e “agregados”, do laboratório de Pasitologia do Coltec e do laboratório de Parasitologia do IQ/USP, em especial aos meus bons amigos Samuel, Simara, Fernandes, Bruna, Luís, Andréia, Juliana, Brisa, Marina, Daniel, Cintia, Mariana, Denise, Celinha, Robertinho, Jamil.

Agradeço ao grupo do laboratório MAS do LNBio (CNPEM/LNLS) pela grande prestabilidade e gentileza durante a obtenção das análises via MS e a CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Aspectos gerais.....	15
1.2. Agente etiológico – <i>Leishmania</i> spp.....	16
1.2.1. Ciclo biológico.....	18
1.2.2. Manifestações clínicas das leishmanioses.....	19
1.2.3. Diagnóstico laboratorial.....	20
1.2.4. Tratamento e prevenção da doença.....	22
1.2.4.1. Resposta imune frente ao parasita <i>Leishmania</i> spp.....	23
1.2.4.2. Desafios e avanços na produção de vacinas.....	25
1.2.5. Diminuição da infecciosidade de <i>Leishmania</i> spp. ao longo do cultivo axênico.....	28
1.3. Proteômica.....	28
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo geral.....	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. METODOLOGIA.....	33
3.1. Animais de experimentação.....	33
3.2. Parasitas.....	33
3.3. Preparação dos parasitas para proteômica e ensaios de infecciosidade.....	33
3.4. Avaliação da infecciosidade <i>in vivo</i> .....	34
3.5. Avaliação da infecciosidade <i>in vitro</i> .....	34
3.6. Análise estatística.....	35
3.7. Eletroforese bidimensional.....	35
3.7.1. Preparação dos extratos totais de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	35
3.7.2. Focalização isoeletrica (IEF).....	35
3.7.3. Redução e alquilação.....	36
3.7.4. Segunda dimensão – SDS-PAGE.....	36
3.7.5. Coloração dos géis e aquisição das imagens.....	37
3.7.6. Análise dos géis para determinação dos <i>spots</i> de interesse.....	37
3.8. Identificação das proteínas – Espectrometria de massa (MS).....	38
3.8.1. Digestão limitada das proteínas.....	38
3.8.2. Identificação protéica.....	39
3.9. Buscas de informações remotas - Scripts PHP.....	40
3.9.1. Gene Ontology (GO).....	40
3.9.2. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).....	41
3.10. Busca de informações na literatura.....	42

3.11. Servidor SCRATCH e suas ferramentas de análise.....	42
3.12. HLA Peptide Binding Predictions.....	43
3.13. <i>Immunoblotting</i> .....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Avaliação da infecciosidade <i>in vivo</i> .....	45
4.2. Avaliação do padrão morfológico.....	46
4.3. Avaliação da infecciosidade <i>in vitro</i> .....	47
4.4. Análise da expressão de proteínas em <i>L. amazonensis</i> .....	49
4.4.1. Eletroforese bidimensional.....	49
4.4.1.1. Padronização das fitas usadas na focalização.....	49
4.4.1.2. Separação das proteínas usando 2-DE.....	49
4.4.2. Análise <i>in silico</i> dos dados da 2-DE e MS.....	51
4.4.2.1. Identificação dos <i>spots</i> com variação de intensidade entre os géis das passagens selecionadas.....	51
4.4.2.2. Identificação das proteínas por espectrometria de massa.....	52
4.4.2.3. Busca de informações importantes de cada proteína - Scripts PHP.....	52
4.4.3. Seleção das proteínas baseada na condição de aumento ou diminuição da intensidade ao longo da cultura por longos períodos.....	53
4.5. Busca de informações e trabalhos na literatura relacionados às proteínas selecionadas.....	55
4.5.1. Avaliação das proteínas de interesse.....	55
4.6. Correlação das proteínas identificadas aos processos celulares – GO Database.....	59
4.7. Correlação das proteínas de interesse com eventos metabólitos – KEGG database.....	59
4.8. Predição de antigenicidade das proteínas.....	61
4.9. Validação das proteínas por <i>Immunoblotting</i> .....	63
5. DISCUSSÃO.....	65
5.1. Variação da infecciosidade dos parasitas.....	65
5.2. Proteínas encontradas com diminuição de expressão ao longo do cultivo axênico.....	66
5.2.1. Proteínas relacionadas à resistência a danos decorridos por compostos reativos de oxigênio ou outras fontes.....	66
5.2.2. Proteínas facilitadoras ou vitais para a infecciosidade do parasita.....	67
5.2.3. Proteínas relacionadas ao controle da síntese protéica.....	68
5.2.4. Proteínas estruturais.....	69
5.3. Proteínas encontradas com aumento de expressão ao longo do cultivo axênico.....	70

5.3.1. Proteínas relacionadas à resistência a danos decorrentes de estresse celular.....	70
5.3.2. Proteínas relacionadas à resposta e proteção do parasita contra fatores externos.....	71
5.3.3. Proteínas relacionadas com a síntese protéica ou reenovelamento de proteínas mal dobradas.....	72
5.3.4. Proteínas relacionadas ao restabelecimento de funções nucleares.....	72
5.4. Metabolismo de <i>Leishmania</i> - Proteínas metabólicas envolvidas com a diminuição de infecciosidade.....	73
5.5. Predição e análise complementar – Análise de Epítomos.....	76
6. RESUMO DOS RESULTADOS.....	77
7. CONCLUSÃO.....	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
9. ANEXO.....	98
9.1. Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG..	98
9.2. Figuras suplementares.....	99
9.3. Tabela suplementar.....	103
9.4. Artigo publicado.....	116



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição geográfica do número de casos relatados de leishmaniose cutânea no ano de 2012 .....	15
Figura 2	– Distribuição geográfica do número de casos relatados de leishmaniose visceral no ano de 2012.....	16
Figura 3	– Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> ao longo do território brasileiro.....	18
Figura 4	– Ciclo biológico do parasita, estágios no flebotomíneo e no hospedeiro humano .....	19
Figura 5	– Infecção de camundongos BALB/c.....	46
Figura 6	– Padrão morfológico de <i>L. amazonensis</i> promastigota entre as passagens R0 e R25.....	47
Figura 7	– Avaliação in da infecciosidade de <i>L. amazonensis</i> promastigota ao longo do cultivo.....	48
Figura 8	– Padronização das fitas usadas para IEF do extrato de <i>L. amazonensis</i> obtido da passagem R10.....	49
Figura 9	– Géis bidimensionais de extratos totais de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> promastigota obtidos de diferentes passagens de cultivo.....	50
Figura 10	- Fluxograma – Passos seguidos para análise <i>in silico</i> dos dados obtidos por 2-DE e MS.....	51
Figura 11	– Representação funcional das proteínas.....	53
Figura 12	– Representação gráfica da variação dos <i>spots</i> nas condições selecionadas.....	54
Figura 13	– Distribuição funcional das proteínas selecionadas no estudo proteômico.....	59
Figura 14	– Distribuição das proteínas de acordo com sua função metabólica.	60
Figura 15	– Validação por <i>Immunoblotting</i> de proteínas de <i>L. amazonensis</i> identificadas após análise por 2-DE.....	64
Figura S1	– Géis bidimensionais de extratos totais de <i>L. amazonensis</i> obtidos de R0.....	99
Figura S2	– Géis bidimensionais de extratos totais de <i>L. amazonensis</i> obtidos de R10.....	100
Figura S3	– Géis bidimensionais de extratos totais de <i>L. amazonensis</i> obtidos de R20.....	101
Figura S4	– Géis bidimensionais de extratos totais de <i>L. amazonensis</i> obtidos de R30.....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Espécies de <i>Leishmania</i> isoladas de pacientes e classificações clínicas associadas.....	17
Tabela 2.	- Bancos de dados que compõem o KEGG.....	41
Tabela 3	- Variação de infecciosidade e número de parasitas por macrófagos ao longo do cultivo axênico.....	48
Tabela 4	- Número de <i>spots</i> identificados a partir das análises dos géis bidimensionais.....	50
Tabela 5	- Condições de variação da intensidade dos <i>spots</i> ao longo do cultivo axênico.....	52
Tabela 6	- Condições selecionadas e número de <i>spots</i> encontrados em cada condição.....	54
Tabela 7	- Identificação das proteínas que apresentaram diminuição significativa de sua expressão.....	56
Tabela 8	- Identificação das proteínas que apresentaram aumento significativo de sua expressão.....	58
Tabela 9	- Análise e Predição de Proteínas Antigênicas pelo servidor SCRATCH e pelo programa HLA Peptide Binding Predictions.....	62
Tabela S	- Tabela com os dados obtidos após análise de 2-DE e MS sobre os 315 spots selecionados.....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-DE:** Eletroforese bidimensional em gel
- ANOVA:** Análise de Variância
- ANTIGENpro:** Ferramenta computacional do servidor Scratch
- ApoA-1:** Apolipoproteína A-1
- ATP/ADP:** Adenosil trifosfato/ adenosil bifosfato
- BCG:** Vacina contra tuberculose *Bacillus Calmette-Guérin*
- C3H:** Camundongo linhagem C3H
- cAMP:** Adenosina monofosfato cíclica
- LT CD4+:** Linfócitos T auxiliares CD4+
- CD40:** Proteína CD40
- LT CD8+:** Linfócitos T citotóxicos CD8+
- CoA:** Coenzima A
- DAT:** Teste direto contra antiglobulinas, também conhecido como teste de Coombs
- DC:** Célula dendrítica
- DTT:** Ditioneitol
- ECL:** Método de detecção de proteínas para Western Blotting
- EEF2:** Fator de alongação eucariótico 2
- ELISA:** *Enzyme Linked immunoabsorbant assay*
- ERK 1/2:** Cinase regulada por fator externo 1/2
- ESI-QUAD-TOF:** Um dos tipos de equipamentos usados para espectrometria de massa: ESI *eletronspray*; QUAD quadrupolo; TOF Tempo de voo
- FGV:** Vacina de primeira geração
- FML:** Ligante fucose manose
- GI ou gi:** Número identificador da sequência usado pelo NCBI. Existem dois tipos. Nesse trabalho foi usado o GI referente a proteínas.
- GO:** Ontologia do gene
- Gp63:** Glicoproteína 63
- GRP78:** Proteína regulada por glicose 78
- GSK 3:** Cinase glicogênio sintase 3
- GTP:** Guanosil trifosfato
- HIV:** Virus da imunodeficiência humana
- HLA:** Antígeno leucocitário humano
- Hpr:** Proteína relacionada a Haptoglobulina
- HSP27:** Proteína do choque térmico 27
- HSP40:** Proteína do choque térmico 40

**HSP70:** Proteína do choque térmico 70

**HSP83:** Proteína do choque térmico 83

**IEF:** Focalização isoeletrica

**IFN- $\gamma$ :** Interferon gama

**IgG:** Imunoglobulina G

**IL-12:** Interleucina-12

**IL-13:** interleucina-13

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina-1 $\beta$

**IL-4:** Interleucina-4

**iNOS:** Óxido nítrico síntese induzível

**kDa:** Quilo Daltons

**KEGG:** Abreviação do nome do banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

**kVh:** QuiloVolt por hora

**LACK:** Proteína homóloga de *Leishmania* do receptor de cinase C ativada

**LAMP:** Abreviação do nome da técnica *Loop mediated isothermal amplification*

**LC:** Leishmaniose cutânea

**LCD:** Leishmaniose cutâneo-difusa

**Leish-111f:** Proteína híbrida formada pelo fusão de 3 antígenos

**LMC:** Leishmaniose muco-cutânea

**LT:** Leishmaniose tegumentar

**LV:** Leishmaniose visceral

**mA:** Mili-Amper

**MAPA:** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil

**MHC:** Complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

**MHC-I:** Complexo principal de histocompatibilidade tipo I ou classe I

**MHC-II:** Complexo principal de histocompatibilidade tipo II ou classe II

**MicroRNA:** Micro ácido ribonucleico

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensageiro

**MS/MS:** Tipo de sequenciamento feito por espectrometria de massa, também conhecido como sequenciamento em *tandem*

**MS:** Espectrometria de massa

**MST/LST:** Teste de pele de Montenegro

**NADPH/NADP:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido/oxidado

**NASBA:** *Nucleic acid sequence based essay*

**NCBI:** Centro Nacional de Informações Biotecnológicas

**PBS:** Tampão fosfato

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**PHP:** Linguagem de programação *PHP: Hypertext Preprocessor*

**PMF:** método de análise usando espectrometria de massas: *Peptide mass fingerprinting*

**PMSF:** Fluoreto de fenilmetilsulfonila

**RIFI:** Reação de imunofluorescência indireta

**RPMI:** Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

**SDS-PAGE:** Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

**SFB:** Soro fetal bovino

**SGV:** Vacina de segunda geração

**SOLpro:** Ferramenta computacional do servidor Scratch

**SUMO:** Pequena proteína modificadora tipo Ubiquitina

**SVM:** Máquina de vetores de suporte

**TBS-T:** Tampão tris com Tween 20

**TDR:** Programa especial para pesquisa e treinamento relacionado a doenças tropicas da Organização Mundial de Saúde.

**Th1:** Subtipo de linfócitos T auxiliares CD4+

**Th2:** Subtipo de linfócitos T auxiliares CD4+

**UDP:** Uridina difosfato

**UPLC:** Cromatografia líquida de ultra performance

**UV:** Ultravioleta

**VSG:** Glicoproteína variante de superfície

## Resumo

As leishmanioses são doenças que afetam indivíduos em cinco continentes, sendo endêmicas em 98 países, incluindo o Brasil. A cada ano são reportados oficialmente 58.000 novos casos de leishmaniose visceral (LV) e 220.000 novos casos de leishmaniose cutânea. A espécie *Leishmania amazonensis* é um dos agentes causadores das leishmanioses, podendo levar a uma ampla variedade de manifestações clínicas da doença. O objetivo desse estudo foi analisar a relação entre o cultivo axênico de *L. amazonensis* por longos períodos de tempo e a variação da capacidade infectiva dos parasitas, no intuito de identificar proteínas que possam estar envolvidas nesse processo. Para isso, parasitas em fase estacionária foram cultivados por 150 dias e amostras foram coletadas a cada 50 dias. As amostras foram utilizadas para avaliar a infecciosidade dos parasitas por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*, e para uma caracterização proteômica. Em relação aos resultados obtidos, após a realização da eletroforese bidimensional, 315 spots apresentaram variação de intensidade ao longo do cultivo, sendo que 258 spots foram identificados por espectrometria de massa. Das 56 proteínas selecionadas, 37 e 19 apresentaram diminuição ou aumento significativo de sua expressão, respectivamente, ao longo do cultivo. Dessas proteínas, cinco tiveram sua variação de expressão validada por *Immunoblotting*. As análises da eletroforese bidimensional associada com a espectrometria de massas e estudos por bioinformática indicaram que a diminuição de infecciosidade em parasitas cultivados por longos períodos sob condições axênicas pode ser ocasionada pelo controle de vias metabólicas específicas, da atuação de proteínas envolvidas no sistema redox do parasita, ou de proteínas do citoesqueleto. As informações apresentadas nesse estudo podem contribuir para um melhor entendimento dos processos biológicos envolvidos com a diminuição da infecciosidade de *L. amazonensis* quando submetida a culturas axênicas por longos períodos de tempo. Essas descobertas representam uma contribuição para o descobrimento de novos candidatos vacinais, agentes para diagnóstico e/ou alvos imunoterapêuticos contra as leishmanioses, usando as proteínas conhecidas e/ou hipotéticas que apresentaram variação significativa de sua expressão ao longo das culturas axênicas.

## Abstract

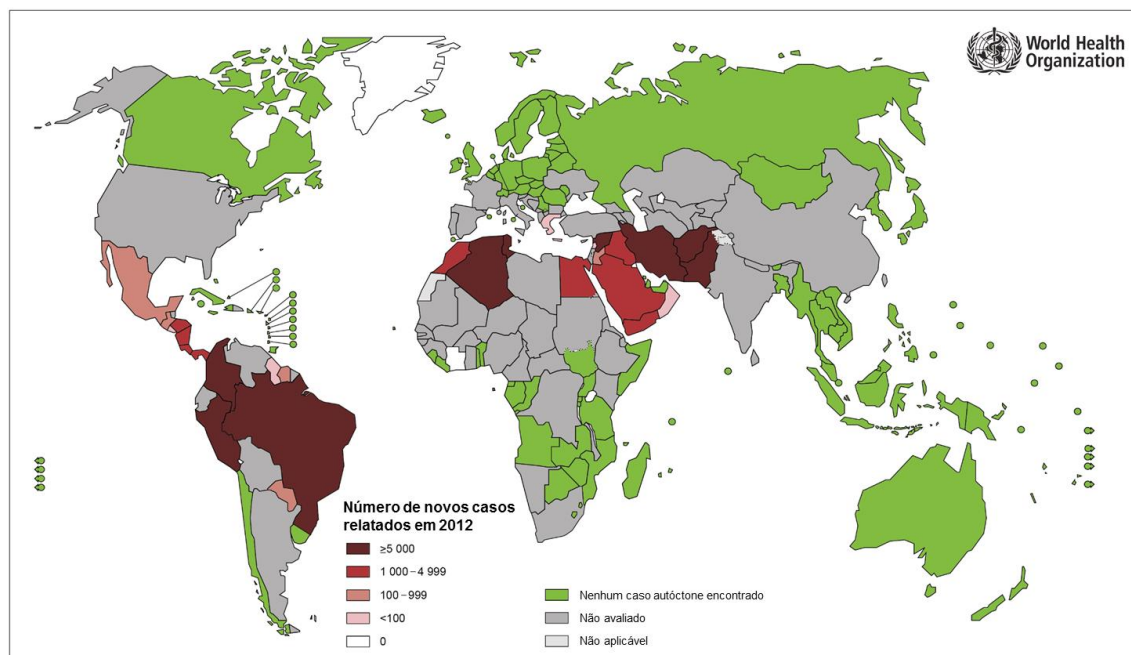
Leishmaniasis is an endemic disease that affects people in five continents and 98 countries, including Brazil, being officially reported 58,000 new cases of visceral leishmaniasis and 220,000 new cases of cutaneous leishmaniasis each year. *Leishmania amazonensis*, a causative agent of leishmaniasis, can cause a wide variety of clinical manifestations of the disease. The aim of this study was to analyze the relationship between the *L. amazonensis* axenic cultivation for long periods with the infectivity ability of the parasite in order to identify proteins that may be involved in this process. For that purpose, *L. amazonensis* stationary phase was grown for 150 days and aliquots were collected every 50 days, been used to analysis of of infectivity of the parasite by *in vitro* and *in vivo* experiments, and to proceed with proteomic characterization. After 2-DE, from the 315 spots with variation in intensity throughout the cultivation, 258 were identified by mass spectrometry. From the 56 selected proteins, 37 have possible decreased of expression over the passages and 19 different proteins showed possible increased of expression during the parasite cultivation. The expression variation of five of these proteins was validated by *Immunoblotting*. Two-dimensional electrophoresis associated with mass spectrometry and bioinformatics analyzes showed that loss of infectivity observed in cultured parasites for prolonged periods under axenic conditions may be caused by the control of specific metabolic pathways, as well as by the control of the performance of the proteins involved with the parasite redox system or by changes in cytoskeletal proteins. The information presented in this study may help to a better understanding of biological processes involved in the reduction of infectivity of *L. amazonensis* when subjected to axenic cultures for long periods of time. Moreover, these findings may represent a contribution to the elucidation of novel vaccine candidates, diagnostic agents and / or immunotherapeutic targets against the parasite-induced disease, using known and hypothetical proteins with significant changes in their expression along the axenic cultures.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos gerais

As leishmanioses são doenças endêmicas em 98 países, com maior número de casos sendo registrados no Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Índia, Irã, Síria, Sudão, Sudão do Sul e Peru (Alvar *et al.*, 2012). Cerca de 350 milhões de pessoas estão expostas aos riscos da infecção e estima-se que 1,5 a 2,0 milhões de novos casos ocorram a cada ano, resultando em 20 a 30 mil mortes anuais (WHO, 2014).

As **Figuras 1 e 2** mostram os países com maior número de casos estimados no mundo de leishmaniose cutânea e visceral, respectivamente, no ano de 2012.



**Figura 1 – Distribuição geográfica do número de casos relatados de leishmaniose cutânea no ano de 2012 (WHO, 2014).**



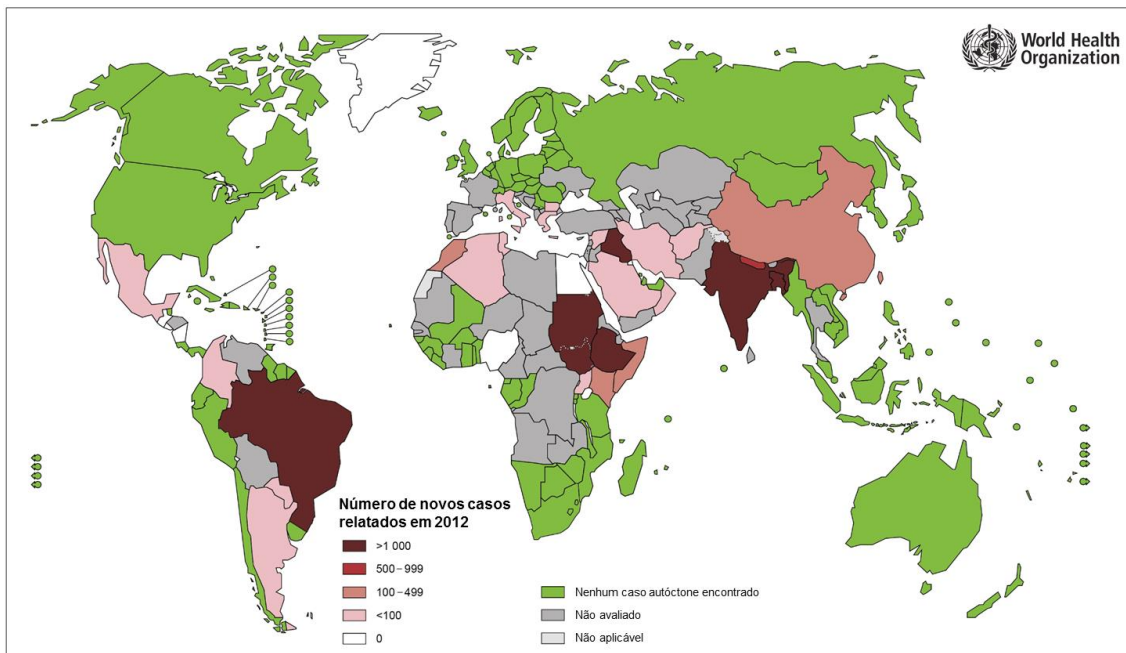


Figura 2 – Distribuição geográfica do número de casos relatados de leishmaniose visceral no ano de 2012 (WHO, 2014).

## 1.2. Agente etiológico – *Leishmania* spp.

Os parasitas causadores das leishmanioses são protozoários do gênero *Leishmania* pertencentes ao Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae (WHO, 2010).

Esses parasitas possuem um núcleo definido, além de uma única mitocôndria com uma rede de DNA complexa, nomeada de cinetoplasto. Dependendo do estágio evolutivo, eles podem apresentar formas estruturais distintas. A forma amastigota é encontrada no interior de vacúolos lisossomais em células infectadas do hospedeiro. Se caracteriza por uma célula de forma oval, que apresenta um flagelo curto, não exteriorizado e cinetoplasto em um dos lados da célula. A forma promastigota é alongada, extracelular, móvel, sendo encontrada dentro do trato alimentar do vetor. Apresenta núcleo central, com cinetoplasto localizado em frente ao núcleo e flagelo em uma das extremidades não aderido ao corpo basal (Pulvertaft & Hoyle, 1960). As formas promastigotas podem ser classificadas como promastigota procíclica, capazes de se multiplicar no trato digestório do inseto, e promastigota metacíclica, forma infectiva encontrada na parte anterior do intestino ou em regiões do aparelho bucal do vetor (Olivier *et al.*, 2005).

Existem mais de 30 espécies de *Leishmania* relatadas que podem ser classificadas em pelo menos três subgêneros, onde dois deles são compostos por espécies capazes de infectar mamíferos: *Leishmania* (*Leishmania*), composto por

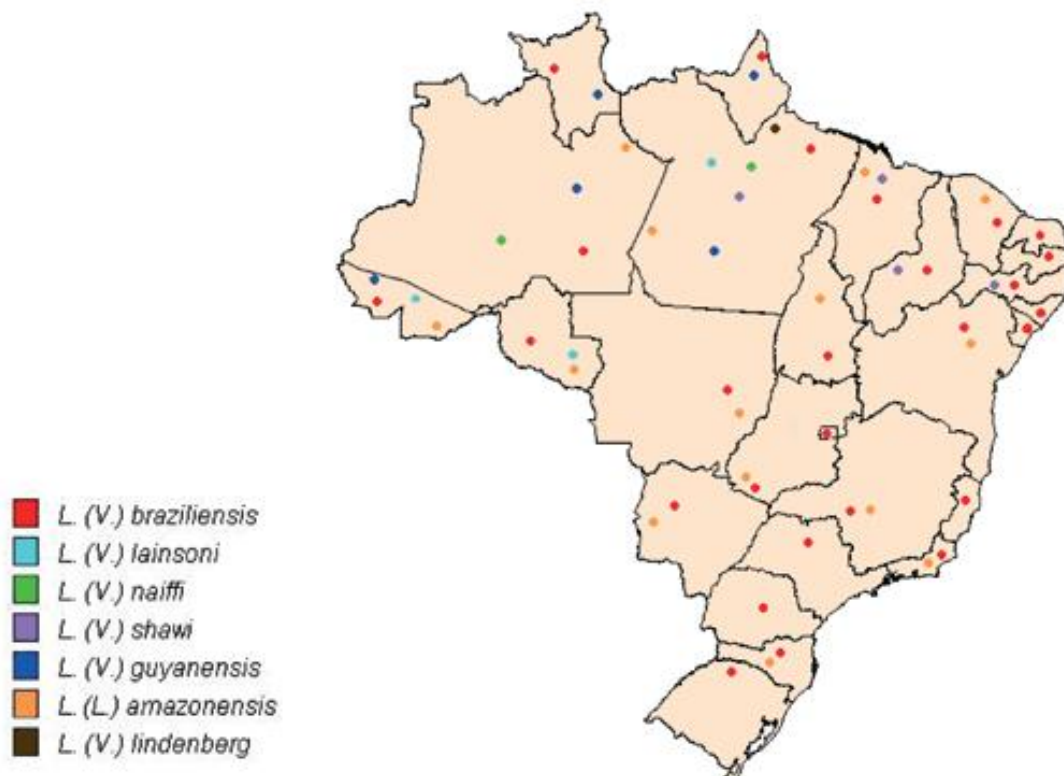
espécies que crescem facilmente em cultura, provocam grandes lesões nodulares em hamster, e que se desenvolvem no intestino médio e anterior do flebotomíneo; e *Leishmania (Viannia)*, outro subgênero composto por espécies que apresentam desenvolvimento deficitário em meio de cultivo convencional, desenvolvimento lento ou visceralizante em hamsters experimentalmente infectados e desenvolvem-se no intestino posterior do inseto vetor (Lainson & Shaw, 1987). Pelo menos 20 espécies são patogênicas ao homem, causando uma ampla variedade de sintomas clínicos (Cupolillo *et al.*, 2000). A **Tabela 1** mostra a caracterização clínica conhecida de algumas espécies de *Leishmania* presentes nas Américas, com enfoque nas espécies presentes no Brasil, e no Velho Mundo.

**Tabela 1 - Espécies de *Leishmania* isoladas de pacientes e classificações clínicas associadas.**

Área de Distribuição	Espécie	Classificação clínica
Novo Mundo	<i>L.(L.) amazonensis</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa anérgica, leishmaniose muco-cutânea, leishmaniose visceral (raramente)
	<i>L. (L.) mexicana</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa anérgica
	<i>L.(V.) braziliensis</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea
	<i>L.(V.) guyanensis</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea
	<i>L.(V.) lainsoni</i>	Leishmaniose cutânea
	<i>L.(V.) naiffi</i>	Leishmaniose cutânea
	<i>L.(V.) shawi</i>	Leishmaniose cutânea
Novo e Velho Mundo	<i>L.(L.) infantum (chagasi)</i>	Leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea (raramente)
Velho Mundo	<i>L.(L.) donovani</i>	Leishmaniose visceral
	<i>L.(L.) aethiopica</i>	Leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa anérgica
	<i>L.(L.) major</i>	Leishmaniose cutânea
	<i>L.(L.) tropica</i>	Leishmaniose cutânea

A espécie *L. amazonensis* é associada às formas clínicas de LC e LCD (Garcez *et al.*, 2002). Entretanto, Abreu-Silva e colaboradores (2004) demonstraram que camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *L. amazonensis* desenvolveram manifestações patológicas similares à LV. Caso similar foi descrito por Barral e colaboradores (1991) em pacientes humanos diagnosticados com LV no Estado da Bahia, onde um estudo de genotipagem revelou que 41 indivíduos com LV foram infectados por *L. amazonensis*, demonstrando assim a variedade de manifestações clínicas que podem ser causadas por essa espécie do parasita.

*Leishmania amazonensis* é uma espécie bem distribuída em todo o território nacional, estando presente em áreas de florestas primárias e secundárias da maioria dos estados componentes da Amazônia Legal (Acre, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Tocantins) e nos estados da Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro (CENEPI, 2007; **Figura 3**).



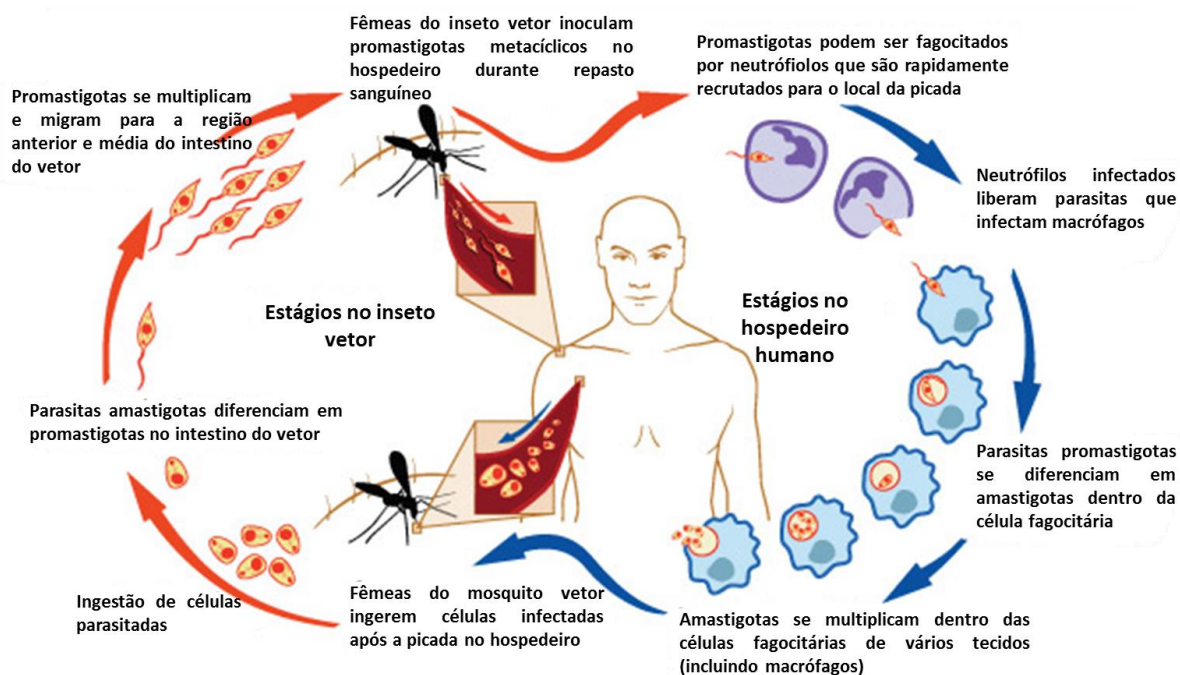
**Figura 3 – Distribuição das espécies de *Leishmania* ao longo do território brasileiro** (Fonte: SVS/MS; publicado em CENEPI, 2007).

### 1.2.1. Ciclo biológico

O vetor transmissor do parasita *Leishmania* é um inseto da Ordem Diptera, Família Psychodidae, Sub-Família Phlebotominae, pertencente aos gêneros *Phlebotomus* em países do Velho Mundo e *Lutzomyia* nas Américas, sendo que apenas a fêmea possui hábitos hematófagos e é capaz de transmitir o parasita ao hospedeiro mamífero (Grimaldi & Tesh, 1993).

A infecção do parasita ocorre após a picada do vetor flebotomíneo, havendo a ingestão, junto com o sangue do hospedeiro mamífero, de células do hospedeiro infectadas por parasitas na forma amastigota. As células infectadas podem se romper no trato digestório do vetor liberando os parasitas que se diferenciam na forma promastigota procíclica, multiplicando-se no trato digestivo médio e anterior do vetor, diferenciando-se para a forma paramastigota. Ao se soltarem do epitélio, evoluem para forma promastigota metacíclica, altamente infectiva. Nesse estágio os parasitas possuem alta mobilidade e dirigem-se para a parte anterior do aparelho bucal do vetor, onde se aderem. Quando o vetor infectado realiza novo repasto sanguíneo, este pode inocular parasitas na forma promastigota metacíclica junto com sua saliva. Após a fagocitose nas células do sistema fagocítico-mononuclear, o parasita perde seu flagelo

no vacúolo parasitóforo e converte-se na forma amastigota, multiplicando-se no interior do vacúolo por fissão binária. As multiplicações sucessivas podem resultar no rompimento da célula e, conseqüentemente, na liberação dos parasitas, que podem ser fagocitados por novas células, dando continuidade à infecção no hospedeiro mamífero (Medeiros *et al.*, 2005; Pêsoa & Martins, 1988) (**Figura 4**).



**Figura 4 – Ciclo biológico do parasita, estágios no flebotomíneo e no hospedeiro humano** (adaptado de <http://www.niaid.nih.gov/topics/Leishmaniasis/pages/lifecycle.aspx>).

O papel do homem no ciclo biológico do parasita é o de hospedeiro final, caracterizando a doença como uma zoonose (WHO, 2010).

### 1.2.2. Manifestação clínica das leishmanioses

A evolução clínica das leishmanioses é determinada, principalmente, pela espécie infectante do parasita e pelas características genéticas e imunidade do hospedeiro mamífero (Hommel *et al.*, 1995). As leishmanioses podem ser classificadas em duas categorias clínicas: a leishmaniose tegumentar (LT), que compreende as formas cutânea, muco-cutânea e cutâneo-difusa, e a leishmaniose visceral (LV) (Kane & Mosser, 2000).

A leishmaniose cutânea (LC), a forma clínica mais incidente da doença, caracteriza-se pela presença de uma lesão característica no local da picada pelo vetor (Ashford, 2000). LC humana apresenta um espectro clínico que varia de ulcerações na pele a vários graus de degradação da mucosa (Gill & Beeching, 2009) e pode ser causada por *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. lainsoni* e *L. guyanensis*

nas Américas e por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* em países do Velho Mundo (Ashford, 2000). A mortalidade associada com LC não é significativa, contudo a sua morbidade é muito importante por causar lesões desfigurativas e cicatrizes que podem ocasionar estigmatização social dos indivíduos acometidos pela doença (Kassi *et al.*, 2008).

Na leishmaniose muco-cutânea (LMC), uma forma clínica debilitante da doença, há ocorrência de lesões no nariz, na boca e garganta, que podem evoluir a lesões desfigurantes. Espécies como *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana* podem causar essa forma clínica (Weigle & Saravia, 1996).

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD), uma forma anérgica e não-ulcerativa de LT, caracteriza-se pela presença de lesões disseminadas em várias regiões do corpo, sendo associada a uma fraca resposta celular pelo indivíduo infectado. As lesões podem tornar-se crônicas, debilitando o indivíduo; e é, normalmente, causada pelas espécies *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. venezuelensis* (Grimaldi & Tesh, 1993).

A LV é uma forma clínica de leishmaniose que acomete as vísceras do paciente e é, invariavelmente, fatal, quando com sintomatologia aguda e não tratada, sendo causada principalmente pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) (Roberts *et al.*, 2000). *Leishmania infantum* é o agente causador da doença estabelecida na América Central, na América do Sul, na Ásia Central, na China, no Mediterrâneo e no Oriente Médio, enquanto *L. donovani* é o agente causador da doença na Índia e leste da África. A doença pode também ser causada por *L. tropica* no velho mundo e *L. amazonensis* no novo mundo, sendo fatal em cerca de 85 a 90% dos casos não tratados e de até 50% dos casos tratados (Gill & Beeching, 2009).

### 1.2.3. Diagnóstico laboratorial

Os sintomas da LT apresentam semelhanças com úlceras tropicais, lepra e câncer de pele (Singh, 2006), embora a infecção nem sempre resulte em manifestação clínica de sintomas. O diagnóstico da LT humana é realizado pela avaliação de parâmetros clínicos e epidemiológicos, porém, para um diagnóstico definitivo, há necessidade da realização de exames parasitológicos que visem à identificação da espécie infectante. Análises microscópicas de aspirados de lesão e/ou cortes histológicos avaliados em lâminas; a inoculação de aspirados de tecidos em hamsters e a cultura de fragmentos de tecidos são os métodos mais utilizados (Tavares *et al.*, 2003).

O diagnóstico clínico da LV é dificultado pela semelhança de seus sintomas com os causados por outras doenças como malária, esquistossomose,

tripanosomíase africana e tuberculose (Kemp, 1997). O diagnóstico laboratorial é baseado na detecção de anticorpos e/ou antígenos específicos aos parasitas, utilizando amostras de soro dos pacientes (Tavares *et al.*, 2003). Nestes casos, a análise por testes imunoenzimáticos são utilizados, porém, não apresentam a capacidade de diferenciar pacientes com a doença na forma sub-clínica, na forma ativa ou indivíduos já curados (Harith *et al.*, 1986). Testes parasitológicos são também utilizados para o diagnóstico, embora se apresentem como métodos invasivos. Outros testes, como a imunofluorescência, o Western-Blot e a reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser utilizados (Ferreira *et al.*, 2013; Reed, 1996). PCR é uma técnica altamente sensível e específica, mas demanda um alto custo em equipamentos, limitando seu uso à hospitais e centros de pesquisa. A confirmação do diagnóstico para LV geralmente é feita pela visualização do parasita em esfregaços de tecidos, em aspirados esplênicos, em materiais extraídos da medula óssea ou de biopsia do fígado (Singh, 2006).

Testes de hipersensibilidade tardia, como por exemplo o teste de pele de Montenegro (MST/LST), são usados para detectar a existência de imunidade mediada por células, usando uma injeção intradérmica de antígenos de *Leishmania*. Após infecção com LV é normalmente obtido um resultado negativo para o teste, sendo que, após sua cura, normalmente é obtido um resultado positivo. Além disso, a sua baixa sensibilidade para diagnosticar LV (cerca de 14%) limita sua utilização (Gidwani *et al.*, 2009).

Estima-se que a proporção entre as infecções clínicas assintomáticas e sintomáticas varie de 1:2,6 a 50:1 em áreas endêmicas diferentes (Chappuis *et al.*, 2007). Essa variação representa um problema para se determinar o potencial de expansão da doença e a quantidade de reservatórios propensos a possíveis infecções futuras, principalmente em áreas de infecção antroponóticas. Para controlar a doença, é de fundamental importância entender os fatores imunológicos geneticamente determinados que regulam a manifestação clínica da mesma (Stockdale & Newton, 2013).

Métodos sorológicos são usados para o diagnóstico da LV, não sendo adequados para o diagnóstico de LT devido à baixa produção de anticorpos contra os parasitas nesse espectro clínico da doença. O maior problema de tais métodos baseia-se no fato de que os anticorpos podem permanecer no organismo por anos, sendo impossível o monitoramento de recidivas da doença (Chappuis *et al.*, 2007). Além disso, uma proporção considerável da população residente em uma área endêmica será erroneamente atestada como positiva, mesmo não tendo histórico clínico de uma

infecção assintomática (Alemeida *et al.*, 2011). Assim, esse tipo de diagnóstico dificulta a diferenciação de indivíduos assintomáticos dos que foram tratados, e a detecção de uma possível recidiva da doença em indivíduos curados. Como exemplos de técnicas que usam métodos sorológicos para diagnóstico de LV, podem ser citadas a ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*), RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) e o DAT (*Direct Antiglobulin Test*). Outras técnicas mais modernas estão disponíveis, como *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) e *nucleic acid sequence based essay* (NASBA), mas apresentam custo elevado.

#### **1.2.4. Tratamento e prevenção da doença**

O tratamento das leishmanioses deve ser realizado para se evitar a mortalidade causada pela LV e reduzir a morbidade provocada pelas formas mais graves de LT. A aplicação de compostos antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>, Glaxo Wellcome, Inglaterra) e o N-metil antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>, Rhône Poulenc Rorer, França) é o método mais utilizado para o tratamento humano (Mutiso *et al.*, 2013). No entanto, o uso desses fármacos pode provocar graves efeitos colaterais aos pacientes. O custo elevado dos medicamentos também é um entrave para o tratamento, pois a maioria dos pacientes infectados têm baixo poder aquisitivo (de Macedo-Silva *et al.*, 2013; Grogl *et al.*, 1991). A Anfotericina B é um antibiótico usado como segunda escolha para o tratamento de leishmaniose desde a década de 60 em áreas com alto índice de resistência aos compostos antimoniais pentavalentes. Esse composto apresenta atividade contra *Leishmania* spp. devido à sua maior afinidade pelo ergosterol do que pelo colesterol (Goad *et al.*, 1984). A utilização dessa droga é limitada por ela apresentar toxicidade associada a graves efeitos colaterais e administração parenteral lenta (Sundar *et al.*, 2004). A Miltefosina é a primeira droga de administração oral registrada para o tratamento da LV e mais recentemente, para o tratamento da LC (Croft & Engel, 2006). Sua eficácia foi comprovada por diversos estudos, inclusive estudos multicêntricos clínicos de fase III desenvolvidos em colaboração com a Organização Mundial da Saúde (WHO/TDR) (Engel, 2002; Ganguly, 2002; Sundar *et al.*, 2002, Jha *et al.*, 1999, Sundar *et al.*, 1998). No entanto, o uso disseminado da miltefosina é preocupante devido a seu potencial teratogênico e sua elevada meia vida (150 a 200h), que pode selecionar parasitas resistentes devido a permanência de níveis sub-terapêuticos da droga no sangue de pacientes por algumas semanas após o tratamento (Berman, 2005).

Dessa forma, o controle da transmissão da doença é uma alternativa interessante devido às dificuldades inerentes do tratamento. Além disso, mesmo com

o tratamento, várias formas da doença causam desfigurações e cicatrizes nos indivíduos infectados (Mutiso *et al.*, 2013). A prevenção da transmissão das leishmanioses pode ser avaliada sob quatro modos: controle do reservatório animal, da população de vetores, dos reservatórios humanos e por intervenções simultaneamente implementadas. Entretanto, a variedade de espécies do parasita faz com que esse tipo de medida seja uma difícil tarefa. Além disso, as leishmanioses apresentam-se como doença zoonótica nas Américas, sendo mantidas principalmente por ciclos naturais envolvendo vetores e reservatórios silvestres. A capacidade de adaptação do parasita também deve ser considerada, sendo que, mesmo na ausência de seu reservatório natural, ele possa sobreviver em outros hospedeiros presentes em seu habitat (Desjeux, 2001; Kamhawi, 2000), o que dificulta o controle. A eutanásia de cães infectados tem sido o principal método de controle do reservatório animal adotado pelo serviço de saúde pública do Brasil, no entanto, sua efetividade tem sido questionada (Shaw, 2007). O tratamento de cães infectados, além de ser pouco efetivo, não é recomendado em áreas endêmicas, já que o parasita pode continuar infeccioso mesmo em cães que respondem ao tratamento (Tesh, 1995).

Estudos mostram que camundongos podem adquirir imunidade contra a reinfecção após a cura da leishmaniose causada pela espécie *L. major* (Scott *et al.*, 2004; Reed & Campos-Neto, 2003), e que 80 a 90% das infecções em humanos são assintomáticas, estando associadas com uma forte resposta imunológica mediada por células, sendo que organismos de pacientes recuperados desenvolvem alta resistência à reinfecção (Melby & Anstead, 2001). Essas observações tem estimulado a realização de pesquisas buscando à identificação de antígenos e adjuvantes que possam ser utilizados como uma medida efetiva de controle e até para tratamento da doença (Zanin *et al.*, 2007; Coelho *et al.*, 2003). A vacinação profilática tem apresentado grande efetividade para controlar infecção e a endemia de várias doenças infecciosas (Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007). Embora grande esforço esteja sendo feito, nenhuma vacina contra a leishmaniose humana ainda foi licenciada (Reithinger *et al.*, 2007). O desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a doença enfrenta grandes desafios (Postigo *et al.*, 2007).

#### **1.2.4.1. Resposta imune frente ao parasita *Leishmania* spp.**

A imunidade contra *Leishmania* spp. é mediada tanto pela resposta imune inata quanto pela resposta adaptativa, necessitando de uma ativação efetiva de macrófagos, células dendríticas (DCs) e de antígenos específicos, capazes de serem reconhecidos por células CD4+ e CD8+ (Stanley *et al.*, 2007).



A imunidade adquirida em camundongos contra LC induzida por *L. major* é mediada pela produção de IFN- $\gamma$  por células T CD4+ (subtipo Th1) estimuladas pelo parasita, não sendo necessário, nesse caso para essa espécie a atuação da resposta imune através de células T CD8+ (Reiner & Locksley, 1995). Já para realização de uma defesa efetiva contra LV causada por *L. donovani*, ambos os tipos de células T (CD4+ e CD8+) necessitam ser ativados (Melby & Anstead, 2001; Stern *et al.*, 1988). A proteção via Th1 seria mediada por citocinas, tais como IFN- $\gamma$ , responsável pela produção da Óxido-nítrico sintase induzível (iNOS) após ativação de macrófagos (Kaye & Scott, 2011). A supressão da produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas induzida por IL-10 e TGF-B também pode modular uma resposta Th1 inadequada, favorecendo o desenvolvimento da infecção (Weiner, 2001).

*Leishmania amazonensis* é capaz de evadir o sistema de defesa imune de camundongos não estimulando a produção de IFN- $\gamma$  na fase inicial da infecção, além de estimular a produção de IL-4. Essas atuações, juntamente com outros fatores, podem contribuir para as diferenças observadas na resposta inflamatória e na progressão da infecção por essa espécie (Souza *et al.*, 2011). Células T CD8+ são importantes não só para combater e eliminar o parasita do organismo do hospedeiro (Stern *et al.*, 1988), mas também para a geração de uma memória imunológica voltada ao combate de futuras infecções pelo parasita (Stager *et al.*, 2000).

Nesse sentido, existem alguns antígenos avaliados que preenchem parcialmente requisitos para serem empregados como candidatos à vacina para prevenção das leishmanioses, porém, devido à dificuldade de obtenção de um antígeno que seja capaz de induzir imunidade duradoura, especialmente contra espécies que causam LV, e que seja capaz de induzir proteção heteróloga contra mais de uma espécie do parasita; ainda não há uma vacina eficaz disponível para a prevenção efetiva das leishmanioses (Aguilar-Be *et al.*, 2005; Marques-Da-Silva *et al.*, 2005; Ramiro *et al.*, 2003; Sukumaran *et al.*, 2003; Gonzalo *et al.*, 2001; Méndez *et al.*, 2001).

Desta maneira, a aplicação de novas tecnologias para identificação de novos antígenos em *Leishmania* é necessária. Alguns antígenos importantes já foram identificados, como, por exemplo, a proteína A2, originalmente identificada como uma proteína amastigota específica (Charest *et al.*, 1996), está relacionada com a visceralização do parasita (Mizbani *et al.*, 2011; Azizi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2003) e representa um promissor antígeno vacinal, promovendo proteção efetiva em cachorros contra leishmaniose (Fernandes *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2008; Resende *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2001).

#### 1.2.4.2. Desafios e avanços na produção de vacinas

Para o desenvolvimento de uma nova vacina são necessárias estruturas e desenvolvimento laboratorial voltado a pesquisa, locais e condições adequadas para testes clínicos e condições de produção e manufatura. Tal processo deve ocorrer preferencialmente em cinco estágios: descoberta do antígeno, desenvolvimento no estágio pré-clínico, desenvolvimento no estágio clínico, registro e avaliação pós-comercialização (Khamesipous *et al.*, 2006).

As vacinas contra *Leishmania* spp. podem ser divididas em três categorias: (i) vacinas que usam o parasita vivo íntegro (Leishmanização) atenuado; (ii) vacinas que contêm o parasita morto ou frações do mesmo (vacina subunitária), sendo aplicada com ou sem adjuvantes; e (iii) vacinas de DNA, peptídeos sintéticos, e proteínas recombinantes.

Retrospectivamente, a leishmanização corresponde ao uso do parasita vivo para a infecção/imunização de indivíduos saudáveis. Apesar de já ser empregada desde tempos antigos no sudoeste asiático, esse método foi usado em larga escala em Israel na década de 70 e no Irã na década de 80 (Nadim *et al.*, 1983). Também foi usada em um programa massivo de vacinação de mais de 2 milhões de pessoas na guerra Irã-Iraq (Nadim & Javidiam, 1988). O programa de Israel foi cancelado devido a perda da infecciosidade do parasita como resultado das condições da subcultura, sendo reportada imunossupressão. No Irã o programa foi cancelado após a guerra devido a complicações ocorridas para a produção e/ou entrega da vacina durante o conflito. Além disso, alguns casos se tornaram crônicos ou não responsivos ao tratamento (Nadim *et al.*, 1983). Modificações genéricas de parasitas vivos podem ocasionar inativação gênica específica, impossibilitando assim a expressão de certas proteínas não essenciais para a sobrevivência do parasita, que afetam a sua infecciosidade. Essa técnica faz com que o parasita geneticamente modificado se torne sensível a compostos, que podem ser usados para o seu combate, tornando o parasita menos infeccioso e possibilitando seu uso como agente sensibilizador do sistema imune do paciente. Apesar de nenhum desses organismos modificados terem alcançados testes clínicos para serem usados como vacinas, esse método possibilita a indução de proteção por uma infecção limitada, possivelmente, sem qualquer patologia (Khamesipous *et al.*, 2006). Em 2013 apenas uma vacina usando o parasita vivo estava em uso no Uzbequistão, composta de 50% do parasita *L. major* inativado e 50% do parasita virulento (Mutiso *et al.*, 2013). O grande problema associado com essa vacina está na padronização e no controle de qualidade. Vantagens do uso de

organismos vivos constituem-se em: custo reduzido para desenvolvimento da vacina, tempo reduzido para sua avaliação e maior probabilidade de efeito protetor (resposta imune desencadeada por múltiplos estímulos). As desvantagens baseiam-se na duração das lesões (3 a 13 meses) não-tratadas (Aebischer *et al.*, 1993), e na possibilidade de recorrência em indivíduos imunossuprimidos, o que inviabiliza o uso de parasitas vivos em áreas com alto risco de infecções por HIV (Khamesipous *et al.*, 2006). A vacinação usando parasitas vivos virulentos em áreas onde o vetor está bem estabelecido pode aumentar o risco de infecção a indivíduos não vacinados.

Vacinas feitas a partir de parasitas inteiros inativados, ou a partir de suas frações foram iniciadas no Brasil em 1940. A primeira vacina composta por cinco isolados e quatro espécies de *Leishmania* foi testada a partir de 1970 com intensões profiláticas na Colômbia, Equador, e com intenções terapêuticas no Brasil, sendo adicionada à quimioterapia contra a doença (Genaro *et al.*, 1996). Após vários estudos, os resultados dos testes das vacinas foram taxados como inconclusivos ou de baixa proteção (Mutiso *et al.*, 2013). Apesar de não ter sido obtido o efeito profilático desejado, esses experimentos demonstraram que as taxas de incidência da doença foram menores em indivíduos vacinados submetidos ao teste de Montenegro (MST), do que em indivíduos não vacinados, ou vacinados mas não submetidos ao MST. Isso indica o efeito terapêutico desse tipo de vacina, sendo registrada como adjuvante na terapia com compostos antimoniais no Brasil (Jackson *et al.*, 2002), possibilitando a mesma eficácia do tratamento com o uso de doses bem mais baixas de compostos antimoniais pentavalentes. Na Venezuela, a espécie *L. mexicana* autoclavada foi usada para o tratamento da LC (Convit *et al.*, 2003) e no Equador doses de uma vacina mista com parasitas mortos (*L. amazonensis* e *L. mexicana*) acrescidos de BCG foi usada levando a uma taxa de proteção de 73% (Armijos *et al.*, 1998).

Vacinas derivadas de DNA levam a uma resposta imune acentuada que pode ser causada pela ativação da resposta imune inata, levando a expressão de proteínas recombinantes por longos períodos (Eric, 2007). A molécula de DNA é estável, principalmente, quando comparada com moléculas de proteínas presentes em vacinas recombinantes. Essa estabilidade facilita sua estocagem e distribuição, principalmente, em um ambiente tropical e com possíveis limitações na infraestrutura de saúde regional (Liu *et al.*, 2006). A disponibilidade da sequência genômica dos parasitas está favorecendo o desenvolvimento de vacinas genéticas em relação às convencionais, considerando sua simplicidade, o baixo custo e a flexibilidade de combinar múltiplos genes em apenas um fragmento (Almeida *et al.*, 2002).

Outra vantagem desse tipo de vacinação é a produção do antígeno por longos períodos, evento similar a infecção natural por *Leishmania*, juntamente com a implementação de uma memória imunológica (Scott *et al.*, 2004). A primeira vacina envolvendo expressão de proteínas recombinantes entregue por um plasmídeo foi a codificante para a glicoproteína de superfície de *Leishmania* Gp63 (Xu & Leiw, 1994). Nesse estudo, os níveis de IFN- $\gamma$  aumentaram nas células do fígado de camundongos imunizados, o que não aconteceu com a IL-4. A eficácia protetora do DNA codificante da proteína homóloga de *Leishmania* do receptor de cinase C ativada (*Leishmania* homologue of receptor for activated C-kinase – LACK) também foi comparada em um trabalho subsequente, e com a mesma proteína LACK administrada junto com interleucina 12 (Gurunathan *et al.*, 1997). Uma resposta protetora mais forte foi ocasionada pelo gene LACK sozinho, comparada a resposta obtida quando LACK + IL-12 recombinantes foram administradas. No entanto, foi demonstrado a queda de células T CD8+ durante o tempo de vacinação ou infecção, o que ocasionou a perda da ação protetora induzida pela vacinação com DNA LACK, sugerindo um papel essencial para as células T CD8+ na proteção induzida por vacina de DNA. A vacinação usando a proteína PSA-2 nativa, um antígeno da superfície do parasita *L. major*, juntamente com *Corynebacterium parvum* como adjuvante protegeu camundongos por mediar uma resposta Th1, o que não aconteceu após vacinação usando a proteína recombinante produzida em *E. coli*, inoculada com complexos imunoestimulantes ou *C. parvum* como adjuvantes, não induzindo proteção apesar de mediar uma resposta Th1.

A vacina de DNA induziu uma proteção tanto em BALB/c quanto em C3H contra *L. major*, além de proporcionar a cura significativa da doença já estabelecida, atuando como agente imunoterapêutico (Sjolander *et al.*, 1998). Recentemente, devido a predisposição genética de uma resposta imune individual ou populacional, a ideia de vacinas multiantigênicas tem sido considerada e valorizada. Como exemplo pode ser citado a Leish-111f (Modabber *et al.*, 2004). Leish-111f contém antígenos selecionados a partir de uma biblioteca de *L. major* construída usando sangue de camundongos e pacientes humanos infectados. Leish-111f é a única vacina de segunda geração contra leishmaniose que alcançou a experimentação em humanos apresentando resultados satisfatórios contra LV humana e eficácia terapêutica contra LV canina. (Trigo *et al.*, 2010).

Assim, uma vacina contra *Leishmania* spp. deveria apresentar propriedades como segurança, viabilidade de produção mediante um baixo custo, indução de uma resposta intensa envolvendo células T por longos períodos, eficácia profilática e

terapêutica. Embora não haja vacina humana, atualmente existem duas vacinas desenvolvidas para proteção de cães, licenciadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a vacina sub-unitária Leishmune® (Fort Dodge), produzida a partir da glicoproteína FML (Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Palatnik-de-Sousa *et al.*, 1993) e a vacina recombinante Leishtec® (Hertape Calier Saúde Animal SA), produzida com a proteína A2 (Fernandes *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2008; Coelho *et al.*, 2003).

Diante dos medicamentos pouco efetivos, dos tratamentos com custo elevado, da possibilidade de reincidência da doença e da resistência dos parasitas aos fármacos usados no tratamento, existe a necessidade de se identificar novos alvos no parasita para que os mesmos sejam utilizados como forma de prevenção dessa importante doença.

#### **1.2.5. Diminuição da infecciosidade de *Leishmania* spp. ao longo do cultivo axênico**

Em 1993, Grimaldi e Tesh relataram que a diminuição da capacidade infectiva da *Leishmania* poderia estar diretamente relacionada com a manutenção dos parasitas em culturas *in vitro* por longos períodos de tempo. Entretanto, pouco é conhecido sobre os mecanismos moleculares envolvidos neste processo. É sabido que os parasitas regulam sua expressão gênica, principalmente, ao nível pós-traducional e, por esse fato, a proteômica pode ser relevante na identificação de proteínas relacionadas às distintas etapas de diferenciação dos parasitas em cultura, para análise de sua virulência e avaliação do aumento da resistência dos parasitas aos fármacos utilizados (Paape *et al.*, 2010).

### **1.3. Proteômica**

A definição de proteoma foi proposta por Mark Wilkins e Keith Williams, em 1993, para referir-se à identificação sistemática do complemento protéico total ao genoma (Blackstock & Weir, 1999; Lopez, 1999). Proteômica se refere a análise do conjunto de proteínas (proteoma) que são expressas a partir do genoma de um dado organismo, tecido ou tipo celular em um determinada situação ou momento (Haynes & Yates, 2000). Contrariamente ao genoma, que funciona como repositório estático da informação genética e cujo conteúdo não muda com o tempo, o proteoma é altamente dinâmico (Cahill *et al.*, 2001). Atualmente é conhecido que o produto gênico pode ser sintetizado em células eucarióticas e procarióticas como resultado de “splicing”

alternativo, também apresentando modificações co- e pós-traducionais (fosforilação, nitrosilação, glicosilação, entre outras) (Jensen, 2004). Além disso, muitas vezes os níveis de RNA mensageiro (mRNA) transcritos não apresentam uma correlação direta com a expressão de proteínas (Mcnicoll *et al.*, 2006; Gygi *et al.*, 1999; Anderson e Seilhamer, 1997). As espécies pertencentes à ordem Kinetoplastida não contêm em seu genoma interrupções (introns) entre as regiões codificantes, exceto para o gene que codifica a polimerase poli-A (Mair *et al.*, 2000). Dessa forma, o evento de “splicing” alternativo não ocorre para formação do mRNA em *Leishmania* spp.. Modificações pós-traducionais e alguns tipos de modificações pós-transcricionais são responsáveis pela variedade de produtos gênicos observados nesses organismos. Assim, técnicas proteômicas correspondem a ferramentas fundamentais para o estudo da expressão de proteínas que desempenhem um papel direto na bioquímica e no funcionamento celular.

A análise proteômica clássica fornece métodos que permitem determinar a identidade e a abundância de proteínas constituintes do proteoma, sendo que o conhecimento da função proteica pode ser inferido pela variação de sua expressão. Os primeiros mapas proteômicos em *Leishmania* foram realizados no início da década de 80 (Saravia *et al.*, 1984; Handman *et al.*, 1983; Handman, *et al.*, 1981). No entanto, a ausência de tecnologias disponíveis à época, como a espectrometria de massa, que pudessem ser aplicadas na identificação de grandes moléculas, impossibilitou a identificação das proteínas de interesse. Pesquisas proteômicas baseadas na avaliação de modelos de expressão de proteínas em *Leishmania* oferecem a possibilidade de analisar funções de diversas proteínas, incluindo aquelas anteriormente identificadas apenas por dados genômicos, sendo consideradas como hipotéticas; bem como novos alvos terapêuticos, candidatos vacinais e/ou marcadores para diagnósticos (Drummelsmith *et al.*, 2003; Göpfert *et al.*, 1999). Em paralelo, estudos foram e vêm sendo realizados para analisar a expressão e diferenciação de proteínas estágio-específicas em *Leishmania* (Brotherton *et al.*, 2010; El Fakhry *et al.*, 2002), sendo a habilidade de resolver proteínas de uma mistura complexa o parâmetro crítico que define o sucesso ou não da análise proteômica.

Uma das principais técnicas proteômicas utilizadas atualmente para separar proteínas presentes em uma mistura é a eletroforese bidimensional (2-DE). Ela foi desenvolvida duas décadas antes do termo proteômica ser criado (Klose, 1975) e possibilita a separação de misturas complexas de proteínas por sua carga molecular líquida (primeira dimensão) e por sua massa molecular (segunda dimensão). Esse tipo de análise fornece vários tipos de informações sobre centenas de proteínas

simultaneamente, como, por exemplo, peso molecular aproximado, ponto isoelétrico, abundância relativa, e possíveis modificações pós-traducionais presentes (Vercauteren *et al.*, 2007).

A técnica 2-DE apresenta algumas limitações como a difícil reprodutibilidade dos géis, a baixa sensibilidade em detectar proteínas de baixa abundância ou altamente hidrofóbicas (decorrente da dificuldade de solubilização das mesmas), a inabilidade de identificar proteínas com valores de pH abaixo de 3 e acima de 10, e com valores de massa molecular abaixo de 10 kDa e acima de 150 kDa, além da possível ocorrência de faixas transversais (“*streaking*”) que dificulta a separação de proteínas básicas (Alaoui-Jamali & Xu, 2006; Bae *et al.*, 2003; Godovac-Zimmermann & Brown, 2001). Eletroforese bidimensional é a técnica mais aplicada para a obtenção de perfis de expressão protéicos provenientes de lisados celulares ou de tecidos, sendo amplamente empregada para separação de proteínas, de suas variantes e de proteínas que apresentam alguma modificação pós-traducional. Por meio dessa técnica podem ser separadas até 15.000 proteínas em um único gel (Gorg *et al.*, 2004).

Após a separação, as proteínas são extraídas do gel e digeridas por sua incubação com proteases, geralmente, usando-se a Tripsina. Fragmentos trípticos resultantes são analisados por espectrometria de massa (MS). Os resultados das massas obtidas são comparados com dados depositados em bancos internacionais, utilizando softwares capazes de identificar as proteínas. A identificação pode ser feita pelo padrão obtido das massas intactas dos fragmentos trípticos (“Peptide Mass Fingerprinting” - PMF), pela seqüência específica de fragmentos sequenciadas pelo equipamento via MS/MS ou pela combinação de ambos. Em geral, a abordagem proteômica 2-DE-MS é utilizada com a finalidade de obter um mapa de referência e/ou o perfil de expressão protéica de um determinado organismo. O objetivo do mapa de referência é definir a identidade e a localização do maior número possível de proteínas de um organismo (Cordwell *et al.*, 2001), que pode ser utilizado como ponto de referência para investigar a resposta de um determinado organismo a um estímulo específico.

Entretanto, o sucesso na construção do mapa de referência de um organismo depende da disponibilidade do genoma seqüenciado do mesmo. Na falta de informações disponíveis de seqüências genômicas, pode-se utilizar genomas incompletos ou genomas de espécies relacionadas (Nugent *et al.*, 2004). O perfil de expressão protéica, por sua vez, pode ser utilizado, por exemplo, para identificar proteínas envolvidas em determinados processos fisiológicos como: proteínas

reguladas em patógenos resistentes à drogas (Drummelsmith *et al.*, 2003); comparação da expressão protéica em resposta a estímulos externos (Guina *et al.*, 2003); mapeamento de alvos moleculares de drogas (Singh *et al.*, 2001); e proteínas específicas para cada estágio de vida de parasitas dimórficos (Bente *et al.*, 2003; El Fakhry *et al.*, 2002).

Neste trabalho, foram aplicadas técnicas proteômicas para obtenção e avaliação dos perfis de expressão protéica nas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*, que foram isoladas de camundongos infectados e cultivadas *in vitro* por longos períodos de tempo. O estudo baseou-se na identificação e caracterização de tais proteínas, estudando seu envolvimento em eventos relacionados com a diminuição de infecciosidade dos parasitas, a fim de identificar novos candidatos vacinais contra as leishmanioses.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a variação da expressão protéica, correlacionando com a infecciosidade *in vitro* e *in vivo*, de *Leishmania amazonensis* recém-isolada de lesões de camundongos BALB/c cronicamente infectados e cultivadas *in vitro* por longos períodos de tempo.

### 2.2. Objetivos específicos

⇒ Avaliar a capacidade infectiva *in vitro* e *in vivo* de prosmatigota de *L. amazonensis* obtidas em diferentes períodos de tempo;

⇒ Determinar o perfil de expressão proteica das culturas nos diferentes tempos por eletroforese bidimensional e validar alguns alvos protéicos por *Immunoblotting*;

⇒ Relacionar os resultados obtidos com dados disponíveis na literatura para a identificação de proteínas relevantes, cuja expressão tenha aumentado ou diminuído significativamente ao longo das culturas, que poderiam tornar-se candidatos a um alvo terapêutico ou a um agente vacinal contra a doença causada por *L. amazonensis*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Animais de experimentação

Camundongos BALB/c fêmeas, de cerca de 8 semanas de idade, foram utilizados neste trabalho. Os animais foram adquiridos junto ao Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia Clínica do COLTEC/UFMG, sob as devidas condições de manejo. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo número 092/2012).

#### 3.2. Parasitas

A cepa *L. amazonensis* IFLA/BR/1967/PH-8 foi utilizada. Os parasitas foram cultivados a 24°C, pH 7.4, em meio Schneider's completo (Sigma Aldrich®), que corresponde ao meio Schneider's suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado por aquecimento (SFB, Sigma Aldrich®), 20 mM de L-glutamina, 50 µg/mL de gentamicina, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, pH 7,4. Os parasitas na forma amastigota-like foram obtidos como descrito por Doyle e colaboradores (1991).

#### 3.3. Preparação dos parasitas para proteômica e ensaios de infecciosidade

Parasitas foram coletados de dois animais infectados com  $1 \times 10^6$  formas estacionárias de crescimento e seguidos por 8 semanas, quando os mesmos foram sacrificados para análise da carga parasitária em diferentes órgãos e comprovação da infecção nos mesmos. No momento do sacrifício, parasitas foram também recuperados da pata infectada dos animais e cultivados em meio de Schneider's, que foi suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB, Sigma) e 1% de penicilina e estreptomicina. Os parasitas foram cultivados em meio Schneider's completo, como descrito acima e o primeiro repique (R0) foi realizado após 3 dias de cultivo *in vitro*, para a diferenciação à forma promastigota e eliminação de contaminantes proteicos e celulares do hospedeiro. Os repiques da cultura *in vitro* foram feitos a cada cinco dias, até a trigésima passagem (150 dias após o início). Alíquotas correspondente a 0 (R0), 50 (R10), 100 (R20) e 150 (R30) dias de culturas foram coletados. O cultivo foi feito de forma independente, sendo feitas 2 garrafas de cultura (5 mL de meio de cultivo) para cada repique de cada animal (4

garrafas de cultura independentes para cada passagem). Para a obtenção do material a ser utilizado nos ensaios (infeciosidade *in vivo* e *in vitro* e eletroforese bidimensional), as culturas foram submetidas à centrifugação por 10 min, a 5.000 x g e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado por 3 vezes em PBS 1x estéril, sendo os parasitas quantificados usando câmara de Newbauer.

### **3.4. Avaliação da infeciosidade *in vivo***

Promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* ( $1 \times 10^6$  células – cultivadas por 5 dias) foram inoculadas na pata de camundongos BALB/c (n=8). O curso da doença foi monitorado em intervalos de semanas pela medição do diâmetro da lesão por um caliper métrico e expresso como o aumento no inchaço da pata de animais infectados comparado com a ferida na pata de animais não-infectados. Oito semanas após a infecção, os animais foram sacrificados e os parasitas presentes na pata infectada, no fígado e no baço foram coletados para quantificação por ensaio de diluição limitante (Coelho *et al.*, 2003). Para avaliação da infeciosidade *in vivo* dos parasitas nas diferentes passagens, camundongos foram infectados com parasitas provenientes das passagens R0 e R30 (n=8, por grupo). O acompanhamento da infecção foi feito por oito semanas, e as análises parasitológicas foram realizadas para determinação do grau de infecção nos animais.

### **3.5. Avaliação da infeciosidade *in vitro***

Macrófagos peritoneais extraídos de camundongos BALB/c foram plaqueados na concentração de  $5 \times 10^5$  células por poço, em placas de cultura celular de 24 poços (Nunc, Nunclon®, Roskilde, Denmark) usando meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB, 2mM L-glutamina, 200 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, pH 7,4. A incubação ocorreu por 2 h, à 37°C, com ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células aderidas foram lavadas 1x com meio RPMI completo para a retirada daquelas não-aderidas. Cerca de  $1 \times 10^6$  e  $5 \times 10^6$  parasitas provenientes das passagens R0, R10, R20 e R30 foram incubados com os macrófagos durante 24 h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram lavadas para a retirada dos parasitas não-fagocitados e coradas pelo método panótico, para determinar a porcentagem de macrófagos infectados e número médio de amastigotas por macrófago. A contagem foi feita em triplicata, usando três lâminas diferentes para cada condição, sendo contados 200 macrófagos por lâmina. O perfil estacionário das

as culturas *in vitro* foi conferido por visualização microscópica e uma titulação prévia foi realizada para determinar o melhor tempo de infecção com os macrófagos.

### **3.6. Análise estatística**

A análise estatística dos experimentos de infecciosidade *in vivo* e *in vitro* foi feita usando o programa GraphPad Prism (versão 5.0, para Windows®). Os dados são representativos de três experimentos independentes, realizados em triplicata, que apresentam resultados similares. As diferenças foram avaliadas por análise de variância (one-way ANOVA), corroborada pelo teste de Bonferroni. Diferenças foram consideradas significantes com  $p < 0,05$ .

### **3.7. Eletroforese bidimensional**

#### **3.7.1. Preparação dos extratos totais de *Leishmania amazonensis***

Os pellets celulares contendo  $2 \times 10^8$  promastigotas na fase estacionária de crescimento provenientes de cada uma das passagens de interesse (R0, R10, R20, R30) foram solubilizados com o reagente *DeStreak Rehydration solution* (GE Healthcare Life Science), acrescido de inibidores de fosfatases (5 mM NaF, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  e 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -glicerofosfato de sódio) e proteases (protease inhibitor cocktail, Sigma Aldrich® e 1 mM de PMSF). Após homogeneização, cada amostra foi ultrasonicada em banho de gelo por 15 min (poder acústico de 50%), e posteriormente centrifugadas a  $20.000 \times g$  por 7 min à 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As alíquotas foram imediatamente congeladas a -80°C, até o momento do uso. A qualidade dos extratos proteicos foi avaliada por gel SDS-PAGE a 12% (Laemmli, 1970). Para cada passagem, foi extraído material protéico de parasitas proveniente de dois animais diferentes, sendo preparadas duas garrafas de cultura para cultivo dos parasitas provenientes de um mesmo animal, totalizando a extração protéica de quatro amostras independentes por passagem (16 amostras totais).

#### **3.7.2. Focalização isoeletrica (IEF)**

A focalização isoeletrica foi realizada usando géis com gradientes de pH imobilizados sobre fitas (Immobiline DryStrips Gels, GE Healthcare) de tamanho constante de 13 cm e com o intervalo de pH determinado linear de 4-7. Utilizou-se o sistema Ettan IPGphor III (GE Healthcare) para a realização da IEF. As amostras

foram descongeladas e diluídas em *DeStreak Rehydration solution* e IPG buffer 1% (GE Healthcare) para um volume final de 250 µL por amostra, contendo 650 µg de proteínas totais. A reidratação foi feita adicionando-se o volume diluído de cada amostra a sua respectiva fita, com a parte de gel voltada para baixo, sobre o volume de amostra diluída, pipetada dentro de um suporte adequado com poços para cada fita separadamente. Para o selamento das fitas, foi utilizado 3 mL de óleo mineral (Cover Fluid, GE Healthcare) por poço, cobrindo totalmente as fitas e mantendo a amostra e as fitas isoladas do ambiente externo. A reidratação foi realizada com um mínimo de 12 h e o máximo de 20 h, na temperatura ambiente, conforme recomendação do fabricante. Após a reidratação, as fitas foram transferidas do suporte de plástico para o sarcófago próprio para uso no sistema de focalização. As fitas foram dispostas com o gel voltado para cima e cobertas novamente por óleo mineral. O aparato foi montado, adicionando a cada ponta das fitas o papel condutor de corrente umedecido em água (*Paper wick*, GE Healthcare) e os suportes que permitem a passagem da corrente. Após a reidratação passiva, a IEF foi iniciada com um patamar de 500 V por 500 kWh, subindo a voltagem em gradiente até 1.000 V por 800 kWh, posteriormente até 8.000 V por 11.500 kWh, sendo mantido em 8.000 V por 7.500 kWh. As fitas foram congeladas à -20°C, até a próxima etapa.

### **3.7.3. Redução e alquilação**

Após a focalização, as fitas foram incubadas em tampão de equilíbrio (75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6 M ureia, 29% glicerol P.A., 2% SDS e 0,001% azul de bromofenol) acrescido de 1% de DTT (Ditiotreitól), por 15 min para a redução do grupo tiol dos resíduos de cisteína, ocasionando o rompimento das ligações dissulfeto. Posteriormente, as fitas foram transferidas para tampão de equilíbrio acrescido de iodoacetamida 2,5% e incubadas por 15 min para a alquilação do grupo tiol livre dos resíduos de cisteína.

### **3.7.4. Segunda dimensão – SDS-PAGE**

Para a segunda dimensão, géis SDS-PAGE 12% foram preparados, sendo utilizado o sistema SE 600 Ruby (GE Healthcare), ideal para géis contendo fitas de 13 cm. Todo o sistema foi conectado a um resfriador modelo *MultiTemp III cooling bath* (Amersham Biosciences). O tampão de corrida foi constituído por Tris base 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1 %, pH 8,3, e mantido a 10°C durante toda a corrida pelo resfriamento. Após a polimerização dos géis, as fitas reduzidas e alquiladas na etapa

anterior foram lavadas e posicionadas nas canaletas com a região ácida da fita posicionada à direita do marcador padrão de massa molecular (BioRad, Broad Range). Em seguida, as fitas foram seladas com solução de agarose 0,5% em tampão de corrida. A migração ocorreu à 15 mA/gel por 30 min e, posteriormente, a 20 mA/gel até o final da corrida. Assim foram feitos 16 géis bidimensionais, um para cada amostra previamente obtida (**Seção 3.7.1**).

### **3.7.5. Coloração dos géis e aquisição das imagens**

Os géis foram fixados, corados (Coomassie coloidal Brilliant Blue G-250; Neuhoﬀ *et al.*, 1988) e descorados. A fixação foi feita usando solução fixadora (50% metanol, 10% ácido acético), incubando os géis por 2 h à temperatura ambiente, sob agitação. A coloração foi feita em 20 h e a descoloração ocorreu ao longo de 16 h, após algumas trocas da solução de descoloração (10% ácido acético). Os procedimentos foram realizados à temperatura ambiente, sob agitação. As imagens foram documentadas usando o aparelho *Image Scanner III* (GE Healthcare) para os géis de poli(acrilamida), seguindo recomendações do fabricante.

### **3.7.6. Análise dos géis para determinação dos *spots* de interesse**

As análises comparativas dos *spots* que apresentaram variação de intensidade ao longo das culturas *in vitro* foram realizadas utilizando o software *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare). Esse software identifica os *spots* presentes na imagem de cada gel, determina a sua intensidade, a média entre os valores de intensidade correspondentes a cada spot correlacionado dentro de uma mesma condição experimental (no caso, as passagens R0, R10, R20 e R30), e a diferença de intensidade entre as médias de cada spot em diferentes condições experimentais. Essa análise possibilita a seleção dos *spots* de interesse para serem identificados, buscando-se as proteínas envolvidas com a infecciosidade dos parasitas.

A delimitação dos *spots* é feita por meio de comparação remota da diferença dos pixels constituintes dos *spots* e do background (menor valor de pixel da vizinhança do spot). Os parâmetros usados para a delimitação remota dos *spots* pelo software foram: área mínima (*minimal area*) 5 pixels, fator de suavidade (*smooth factor*) 5, saliência (*saliency*) 80. Todos os *spots* delimitados pelo software foram conferidos manualmente. Posteriormente, a identificação de cada spot foi feita pela sua posição dentro das imagens, através da inserção manual de marcadores inseridos aos *spots*

mais confiáveis, selecionados pela sua boa intensidade e pela observação dos *spots* vizinhos.

O gel de referência corresponde àquele com melhor resolução, contendo um maior número de *spots* visíveis entre os quatro géis feitos para a separação das proteínas proveniente dos parasitas em uma mesma passagem. Esse gel foi utilizado como principal comparador para a identificação dos *spots* correspondentes nos 3 outros géis, possibilitando a obtenção da média do valor de porcentagem de volume (%Vol) de cada spot protéico. A intensidade dos pixels que formam cada spot foi convertida remotamente pelo programa de análise em um pico representativo, sendo uma base teórica traçada a 75% da altura dos picos para cálculo do valor de volume de cada spot (Vol). O valor de %Vol é obtido pela divisão do volume do spot individual pela soma dos valores de volumes de todos os *spots* presentes no gel, como representado pela equação abaixo:

$$\%Vol = \frac{Vol}{\sum_{S=1}^n Vol_S} \times 100$$

onde, Vol<sub>S</sub> é o volume do spot S em um gel contendo n *spots*. Utilizando %Vol para determinação da intensidade dos *spots* individuais as variações ocorridas por diferenças durante a aplicação da amostra ou devido a diferenças de coloração dos géis são minimizadas.

A comparação dos valores das médias de cada spot entre as passagens foi feita usando o teste estatístico de análise de variância (one-way ANOVA), com nível de significância de 1% ( $p < 0.01$ ). Após as delimitações estatísticas, foi feita também uma restrição para as variações de intensidade entre as médias, sendo selecionados para identificação apenas os *spots* que apresentaram valor de *fold* (maior valor de intensidade média do spot entre as passagens avaliadas, dividido pelo menor valor de intensidade média do mesmo spot) maior que dois (>2.0).

### **3.8. Identificação das proteínas – Espectrometria de massa (MS)**

#### **3.8.1. Digestão limitada das proteínas**

Os *spots* que apresentaram variação significativa entre as passagens foram identificados nos géis, manualmente excisados e descorados com solução contendo 50% de metanol e 2,5% de ácido acético, por 2 h à temperatura ambiente, e por mais 1h após reposição. Posteriormente, os fragmentos de gel contendo os *spots* foram desidratados duas vezes usando 100% de acetonitrila, durante 5 min. A acetonitrila residual foi retirada usando evaporador. Os fragmentos de gel foram rehidratados e as

proteínas foram reduzidas em 10 mM de DTT à temperatura ambiente, por 30 min e alquiladas usando 50 mM de iodoacetamida, por mais 30 min, no escuro. A iodoacetamida foi removida e os fragmentos foram lavados em 25 mM de bicarbonato de amônio por 10 min e posteriormente desidratados em 100% de acetonitrila por 5 min. A acetonitrila foi removida com auxílio do evaporador. A etapa de lavagem foi repetida, seguida por nova desidratação, sendo todo o procedimento realizado à temperatura ambiente. A digestão limitada das proteínas foi realizada com 0,4 µg ou 0,8 µg (para os *spots* mais intensos) de Tripsina (Promega Biosciences). O excesso da protease foi removido e 5 a 20 µL de bicarbonato de amônio 25 mM foi adicionado até cobrir os fragmentos de gel. A digestão foi realizada a 37°C por 18 h, na temperatura ambiente. A extração dos peptídeos do gel foi feita por três incubações, após as quais se coletou e agrupou os sobrenadantes de cada incubação. A primeira incubação foi feita por 10 min com ácido fórmico 5%. As outras duas incubações também foram realizadas por 10 min, mas usando solução 50% de acetonitrila e 5% de ácido fórmico. Um breve *spin* foi feito antes da coleta de cada sobrenadante. As soluções contendo os peptídeos extraídos foram concentradas usando evaporador, até restar aproximadamente 1 µL, sendo ressuspensa em ácido fórmico 0,1% para sequenciamento e identificação das proteínas.

### 3.8.2. Identificação protéica

A identificação das proteínas foi feita nas instalações do Laboratório de Espectrometria de Massas situado nas dependências do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio, CNPEM/ABTLuS, Campinas, SP). Esse procedimento foi conduzido usando um ESI-Quad-TOF, acoplado a um sistema UPLC. Os espectros de massa foram processados pelo programa Protein Lynx V 2.1 (Waters®), e analisados pelo programa MASCOT MS/MS Ion Search (<http://www.matrixscience.com>). Os seguintes parâmetros foram usados para a análise: *enzyme, trypsin; allow-up to 1 missed cleavage; fixed modification, carbamidomethyl (C); variable modification, oxidation (M); peptide tolerance, ±0.1 Da; MS/MS tolerance, ±0.1 Da; peptide charge 1+, 2+ and 3+*. O banco de dados nomeado *Leishmania* foi utilizado para realizar as identificações, possuindo 49.496 sequências e 30.861.888 resíduos encontrados no NCBI, pertencentes à *Leishmania* spp. (junho de 2012).

A identificação das proteínas foi baseada em um limiar de *score* calculado pelo programa. Esse limiar é condicionado pelo tamanho das sequências e pelo número de resíduos das proteínas presentes no banco de dados utilizado. Todas as proteínas



sugeridas apresentaram score maior que o limiar e foram manualmente revisadas para que sejam selecionadas as identificações com a maior cobertura encontrada.

### **3.9. Buscas de informações remotas - Scripts PHP**

Após a identificação das proteínas, algumas informações foram prontamente fornecidas pelo programa Mascot como o número de identificação das proteínas (gi), e o nome da proteína. Outras informações foram obtidas manualmente, seja navegando pelo site do próprio Mascot e copiando manualmente essas informações, ou buscando em outros sites e banco de dados.

Para otimizar a busca das informações sobre as 164 proteínas identificadas após a espectrometria de massa, alguns scripts foram feitos usando a linguagem de programação PHP. Primeiramente, foi feito um script para buscar o número de ascensão de cada uma das proteínas a partir do seu "gi", outro script foi feito para buscar a identificação do UniProt a partir do número de ascensão, e um último para buscar as informações de interesse nos bancos de dados UniProt e Gene Ontology. As informações recuperadas foram: sequência de resíduos de aminoácidos, dados de localização subcelular, função molecular e processo biológico em que a proteína está envolvida, além do número de ascensão e do identificador do UniProt de cada proteína.

#### **3.9.1. Gene Ontology (GO)**

A correlação entre algumas das proteínas identificadas e alguns processos celulares foi feita baseada nos dados garimpados pelos scripts PHP no banco de dados Gene Ontology (GO), complementado com informações da literatura. O banco de dados GO (<http://www.geneontology.org/>, Harris *et al.*, 2004) é relacionado às ontologias sobre anotações gênicas e seus produtos. Em ciência da computação, ontologia é um termo que representa um conjunto de conceitos dentro de um domínio e os relacionamentos entre esses. Ontologias geralmente descrevem indivíduos (objeto básico), classes (conjuntos ou tipos de objetos), atributos (propriedades dos objetos) e relacionamentos (formas de como os objetos podem se relacionar).

O projeto GO tem como objetivo padronizar a representação de genes e produtos de genes entre bancos de dados. O projeto prevê um vocabulário padronizado de termos para descrever as características genéticas de produtos e dados de anotação dos genes, bem como ferramentas para acessar e processar esses dados. Assim, o GO fornece uma ontologia de termos definidos que representam as

propriedades do produto de genes. A ontologia abrange três domínios que podem ser relacionados com o produto gênico: componente celular, que refere-se às partes de uma célula ou de seu ambiente extracelular; função molecular, as atividades elementares de um produto do gene no nível molecular, tais como ligação ou catálise; e processos biológicos, operações ou séries de eventos moleculares com começo e fim definidos, pertinentes para o funcionamento de unidades de vida integrados (células, tecidos, órgãos e organismos).

### 3.9.2. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

A correlação entre as proteínas identificadas e seus processos metabólicos foi feita manualmente, baseado nos dados obtidos pelo banco de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>, Kanehisa, 2002).

O KEGG é um banco de dados integrado, constituído de 15 outras fontes de dados, voltado para o entendimento de funções de alto-nível e de processos complexos envolvendo os sistemas biológicos. Os mapas feitos pelo KEGG são amplamente utilizados para a interpretação biológica de sequências do genoma e de outros dados obtidos por processo de alto rendimento. O link das informações obtidas do genoma e das vias de interação é feito pelo sistema KEGG Orthology, que corresponde a uma coleção de grupos de genes ortólogos manualmente definidos. A **Tabela 2** mostra as 15 fontes de dados constituintes do KEGG.

**Tabela 2 – Bancos de dados que compõem o KEGG.** Nome e conteúdo de cada banco de dados constituintes do KEGG Database (Kanehisa, 2002).

Banco de dados	Conteúdo
KEGG PATHWAY	Mapas de interação
KEGG BRITE	Hierarquias funcionais
KEGG MODULE	Módulos do KEGG
KEGG ORTHOLOGY	Grupos ortólogos
KEGG GENOME	Organismos com genomas completos
KEGG GENES	Catálogo de genes de genomas completos
KEGG COMPOUND	Metabólitos e outras moléculas pequenas
KEGG GLYCAN	Carboidratos
KEGG REACTION	Reações bioquímicas
KEGG RPAIR	Pares de reagentes
KEGG RCLASS	Classes de reações
KEGG ENZYME	Nomenclatura enzimática
KEGG MEDICUS	Doenças humanas
KEGG DRUG	Drogas

Para a busca de dados relacionados com as vias metabólicas no KEGG, foram usados, como dados de entrada, os nomes das proteínas envolvidas com processos metabólicos identificadas previamente pelos dados do GO. Para algumas proteínas, foram atribuídas mais de um papel metabólico, priorizando as vias metabólicas centrais relacionadas ao metabolismo energético e a reposição de componentes fundamentais, com exceção do metabolismo da glutatona, um importante composto ligado à infecciosidade do parasita.

### **3.10. Busca de informações na literatura**

A busca por informações sobre as proteínas de identificadas foi feita manualmente durante o mês de outubro de 2013. Os artigos foram obtidos pelo site do PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), mediante a pesquisa por palavras-chave, como: “infectivity”, “virulence”, “vaccine”, “parasite+infectivity”, “parasite+virulence”, “*Leishmania*+virulence”, “*Leishmania*+infectivity”, “*Leishmania*+vaccine”. Outras palavras-chave também foram usadas na busca por proteínas específicas e alvos terapêuticos.

### **3.11. Servidor SCRATCH e suas ferramentas de análise**

SCRATCH é um servidor voltado a predição de estruturas terciárias e propriedades estruturais das proteínas (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) (Cheng *et al.*, 2005). Esse servidor contém várias ferramentas, cada uma voltada a um determinado tipo de predição. O dado de entrada corresponde unicamente à informação contida na estrutura primária da proteína e as ferramentas predizem, por exemplo, estruturas secundárias, acessibilidade relativa do solvente, regiões de desordem, domínios, pontes dissulfídicas, estabilidades após mutações pontuais, contatos de resíduos, estrutura terciária e antigenicidade da proteína. Nesse trabalho foram usados os dados providos pelas ferramentas SOLpro e ANTIGENpro.

SOLpro prediz a propensão de uma determinada proteína ser solúvel após sua superexpressão em *Escherichia coli* usando uma arquitetura de dois estágios de máquinas de vetores de suporte (*Support Vector Machine* – SVM), que correspondem a um conjunto de métodos computacionais de aprendizado supervisionado que analisam os dados, reconhecem padrões e prediz, a partir de um conjunto de dados de entrada, qual de duas possíveis classes a entrada faz parte. Essa arquitetura é baseada em múltiplas representações da sequência primária. Cada classificador da primeira camada toma como dado de entrada um conjunto distinto de propriedades

que descrevem a sequência. Um classificador SVM sumariza os resultados da predição e prediz se uma proteína é solúvel ou não, assim como sua probabilidade correspondente. Nesse trabalho, proteínas foram preditas como solúveis com valores de probabilidade predita acima de 50%.

ANTIGENpro é um preditor de antigenicidade de proteínas baseado na sequência protéica, independente do alinhamento e do patógeno. As predições são feitas em uma arquitetura de dois estágios baseada na representação múltipla da sequência primária, usando cinco algoritmos de aprendizado. Como na ferramenta SOLpro, um classificador SVM sumariza as predições resultantes e prediz se a proteína é antigênica ou não, além da sua probabilidade correspondente. ANTIGENpro é o primeiro preditor de antigenicidade da proteína inteira treinado usando dados relativos, obtidos por análise de microarray de proteínas antigênicas de cinco patógenos distintos. Nesse trabalho, as predições de antigenicidade protéica acima 0,50 foram consideradas. Dados da literatura foram usados para corroborar com os dados preditos e ajudar na seleção ou eliminação de proteínas interessantes para a continuação do estudo em busca de candidatos vacinais.

### 3.12. HLA Peptide Binding Predictions

A predição de epítomos específicos para LT CD8+ feita pelo programa HLA Peptide Binding Predictions ([http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)) é baseada nas tabelas de coeficientes obtidas de maneira experimental, contendo dados de interação entre peptídeos e moléculas MHC-I de diferentes subtipos. Essas tabelas foram publicadas por Parker e colaboradores (1994), podem ser visualizadas em: [http://www-bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla\\_coefficient\\_viewing\\_page](http://www-bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla_coefficient_viewing_page).

Para a realização das predições a partir da sequência primária de cada proteína, primeiramente, foi selecionado o subtipo de MHC-I. Apesar do programa conter o termo HLA (Human Leukocyte Antigen) em seu nome, ele contém os subtipos mais comuns de camundongos BALB/c (Dd\_revised) e C57/BL (Db\_revised), que foram os usados para essa predição. Assim, apenas foram preditos peptídeos de 9 resíduos capazes de interagir com moléculas de MHC-I, codificadas pelo gene H-2D em ambos os animais. Peptídeos com score acima de 20.000 foram considerados bons epítomos preditos, possivelmente, como capazes de gerar uma resposta de LT CD8+. Esse valor foi recomendado pelo próprio programa.

### 3.13. Immunoblotting

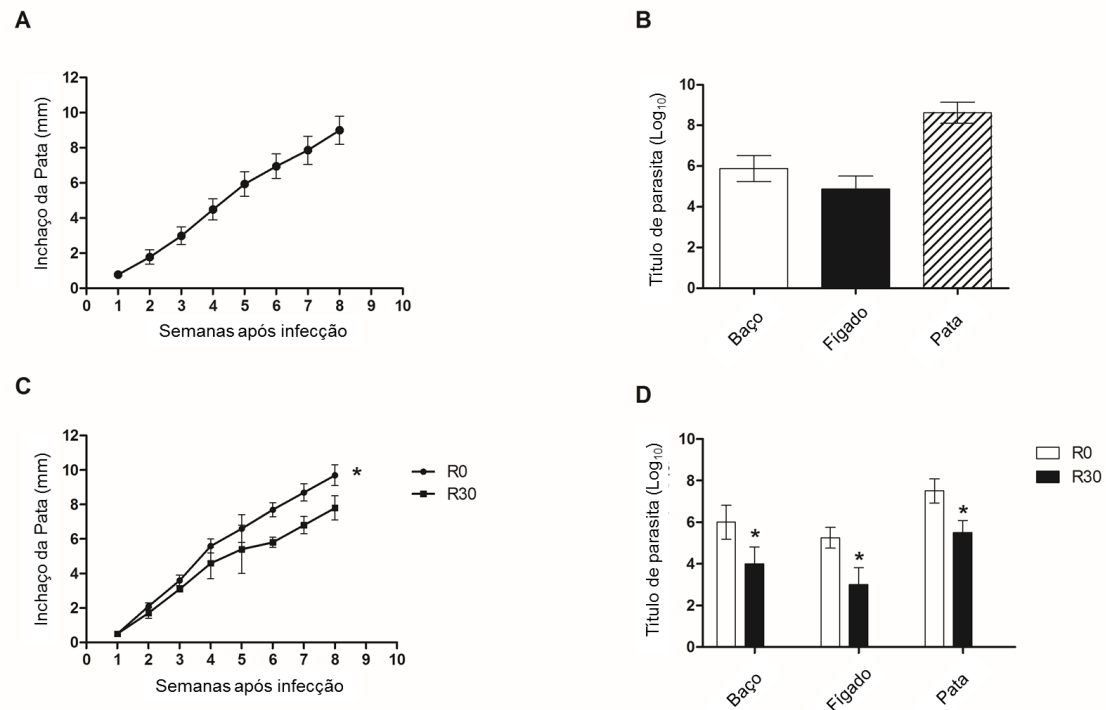
As análises por *Immunoblotting* foram feitas para confirmar a variação na expressão de algumas proteínas que foram identificadas após a eletroforese bidimensional. Para esse fim, extratos totais de *L. amazonensis*, nas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento e amastigotas-like das culturas R0 e R30, foram utilizados para aplicação nos géis. As formas amastigotas-like dos parasitas foram obtidas pela diferenciação *in vitro* dos parasitas nas formas promastigotas das passagens R0 e R30. Assim, 20 µg de proteína total de cada amostra foi separado por gel SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad), e o *Immunoblotting* foi feito usando anticorpos específicos para cada proteína. Os anticorpos primários usados foram anti-*Peroxidoxin* (1:1.000), anti-HSP83 (1:1.000) (anticorpos policlonais, produzidos em coelho, fornecidos pela Dra. Daniela Castanheira Bartholomeu, Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG), anti-GRP78 (1:2.000) (anticorpo policlonal, produzido em coelho, fornecido pela Dra. Maria Júlia Manso Alves, Instituto de Química, USP), anti-*Paraflagellar Rod Protein* 1D (1:2.000) (anticorpo monoclonal, produzido em camundongo, fornecido pela Dra. Maria Júlia Manso Alves, Instituto de Química, USP), anti- $\alpha$ Tubulina (1:4.000) (Sigma Aldrich®, T6074). O anticorpo anti-Paraflagellar reconhece três tipos de proteínas do Paraflagellar rod incluindo a 1D, mas não a 2C (Mattos *et al.*, 2012). A revelação foi feita após a incubação usando anticorpos anti-IgG conjugados com peroxidase produzidos em camundongo (1:1.000) (Sigma Aldrich®, A4416) ou coelho (1:40.000) (Sigma Aldrich®, A6154), e reagente ECL™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare); com equipamento ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare). A coloração por Ponceau S de cada membrana foi usada como controle de aplicação da amostra (Romero-Calvo *et al.*, 2010). A intensidade das bandas encontradas de cada proteína foram determinadas pelo programa ImageJ. A intensidade relativa foi calculada pelo valor normalizado da intensidade da proteína em cada passagem dividido pelo valor normalizado da intensidade das proteínas do extrato total coradas por Ponceau S da canaleta correspondente. Os valores normalizados foram obtidos em relação à amostra R0 do parasita nas formas promastigota ou amastigota em cada membrana. O experimento foi feito em triplicata, usando teste t de Student ( $p < 0,05$ ) para validação estatística.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação da infecciosidade *in vivo*

Camundongos BALB/c (n=8) foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* e foram monitorados semanalmente pela determinação do tamanho médio dos edemas formados, durante oito semanas. Após esse período, a carga parasitária foi avaliada na pata infectada, baço e fígado dos animais, para se verificar a cronicidade da infecção. Na avaliação dos resultados, pode-se observar que os animais desenvolveram tamanhos médios similares de lesão durante as semanas pós-infecção (**Figura 5A**). A carga parasitária encontrada no baço, no fígado e na pata de cada animal infectados também foram similares entre os animais avaliados, sendo encontrados em média  $5,9 \pm 0,6$ ,  $4,9 \pm 0,6$  e  $8,6 \pm 0,5$   $-\log$  de parasitas, respectivamente (**Figura 5B**). Assim, pela homogeneidade da infecção nos camundongos, os parasitas foram isolados da pata dos animais infectados, recuperados e cultivados para a realização dos experimentos de infecciosidade *in vitro* e *in vivo* e das análises proteômicas.

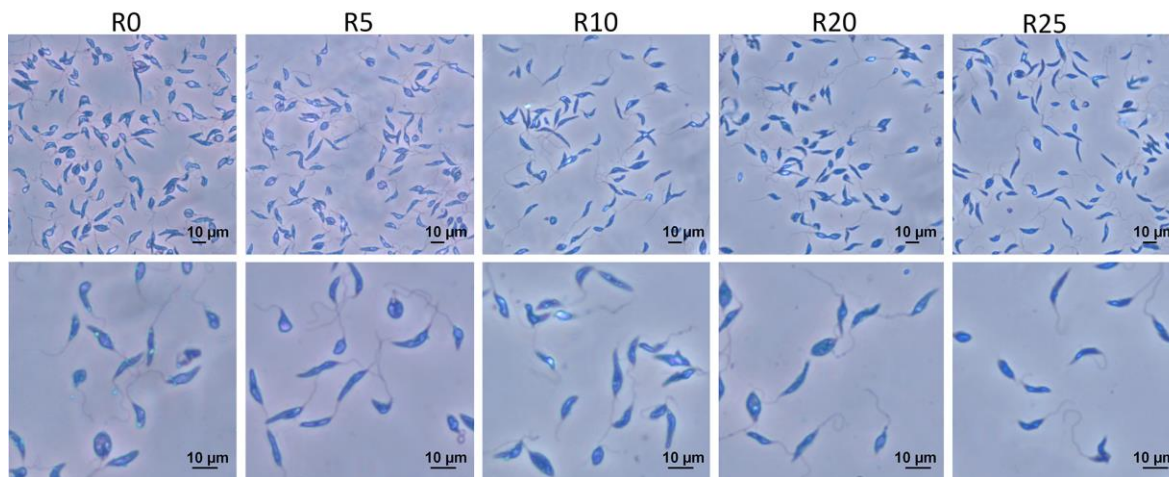
Buscando-se avaliar a variação da infecciosidade *in vivo* entre as diferentes passagens de *L. amazonensis*, formas promastigotas em fase estacionária, obtidas das passagens R0 e R30 foram usadas para infectar camundongos BALB/c (n=8 por grupo, com  $1 \times 10^6$  parasitas por camundongo). Animais infectados com parasitas provenientes da passagem R30 apresentaram menor edema nas patas infectadas, quando comparados com animais infectados com parasitas provenientes de R0 nas oito semanas de avaliação após a infecção (**Figura 5C**). O menor tamanho médio das lesões observado no grupo R30 pode ser relacionado com a menor carga parasitária observada na pata, no baço e no fígado desses animais (**Figura 5D**).



**Figura 5 – Infecção de camundongos BALB/c.** Camundongos (n=8, por grupo) foram infectados de maneira subcutânea com  $1 \times 10^6$  parasitas nas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*. O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente, até 8 semanas após a infecção. Em (A) está representada a variação média do tamanho da lesão do grupo de animais nas 8 semanas. Em (B) está representada a carga parasitária encontrada no baço, fígado e na pata infectada dos animais, após 8 semanas. Outros grupos (n=8) foram infectados de maneira subcutânea com  $1 \times 10^6$  promastigotas em fase estacionária obtidas das passagens R0 e R30. Os dados relacionados com as alterações do diâmetro da lesão ao longo das oito semanas estão representados em (C). Em (D), a carga parasitária foi analisada no baço, fígado e na pata infectada. Os experimentos foram repetidos três vezes e apresentaram resultados similares. \* representa diferenças estatisticamente significantes entre os parasitas obtidos nas passagens R0 e R30 (teste t de Student,  $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Avaliação do padrão morfológico

Não foi observado variação na morfologia das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* ao longo do cultivo *in vitro*, como pode ser observado na imagem de parasitas corados (Figura 6).



**Figura 6 – Padrão morfológico de *L. amazonensis* promastigota entre as passagens R0 e R25.** Coloração por Giemsa de *L. amazonensis* promastigota em fase estacionária proveniente das passagens R0, R5, R10, R20, R25. Barras representam o comprimento de  $10 \pm 0,7 \mu\text{m}$ .

Assim, a diminuição de capacidade infectiva do parasita na forma promastigota ao longo do cultivo até 125 dias (R25) não está relacionada às possíveis alterações na sua morfologia.

#### 4.3. Avaliação da infecciosidade *in vitro*

Para avaliação da infecciosidade *in vitro*, formas promastigotas em fase estacionária de crescimento, recuperadas das as passagens avaliadas (R0, R10, R20 e R30), foram quantificadas e usadas nos experimentos. Quando a proporção de parasitas/macrófagos foi de 2/1, os parasitas obtidos da passagem R0 apresentaram uma taxa de infecção de  $65,1 \pm 1,5\%$ , com o número de amastigotas por macrófago de  $2,2 \pm 0,1$ . Parasitas obtidos da passagem R30 apresentaram uma taxa de infecção de  $14,9 \pm 2,3\%$  e o número de amastigotas por macrófago foi de  $0,5 \pm 0,1$ . Usando a proporção de parasitas/macrófagos de 10/1, a taxa de infecção de R0 foi de  $96,9 \pm 2,6\%$ , e o número de amastigotas por macrófago foi  $7,4 \pm 0,4$ . Usando a cultura R30, a taxa de infecção observada foi de  $59,5 \pm 2,2\%$ , e o número de amastigotas por macrófago foi de  $3,8 \pm 0,4$  (**Tabela 3**).



**Tabela 3- Variação da infecciosidade e do número de parasitas por macrófagos ao longo do cultivo axênico.** Tabela representa os valores de média  $\pm$  desvio padrão encontrados após contagem de parasitas em macrófagos infectados e do número médio de parasitas por célula fagocitária, nas proporções de 1:2 e 1:10 macrófago/parasita, respectivamente.

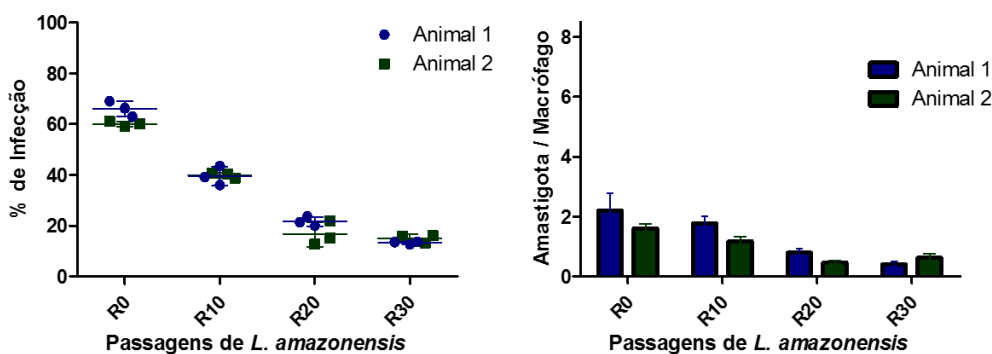
Porcentagem de Macrófagos Infectados				
Proporção	R0	R10	R20	R30
1:2	65,1 $\pm$ 1,5	37,8 $\pm$ 3,2	19,2 $\pm$ 3,6	14,9 $\pm$ 2,3
1:10	96,9 $\pm$ 2,6	82,8 $\pm$ 1,4	64,1 $\pm$ 2,5	59,5 $\pm$ 2,2

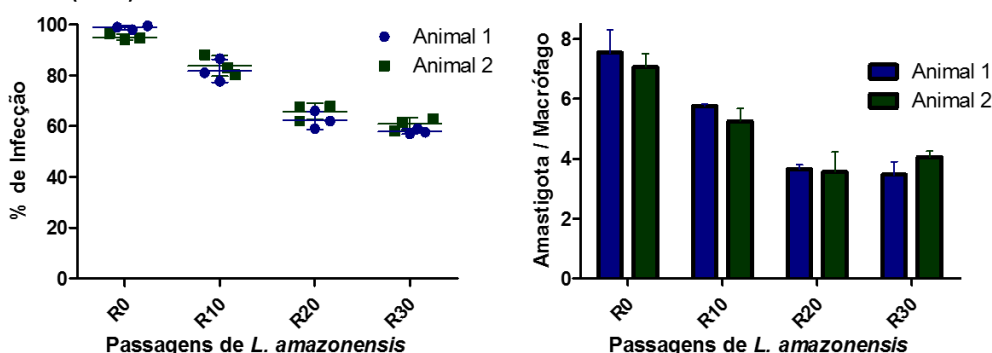
Número de Parasitas por Macrófago				
Proporção	R0	R10	R20	R30
1:2	2,2 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1
1:10	7,4 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 0,8	4,3 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,4

Assim, houve uma diminuição dos valores representativos da infecciosidade acompanhado pelo número de parasitas no interior das células fagocitárias em ambas as concentrações de parasita estudadas e uma possível estabilização entre as passagens R20 e R30. A **Figura 7** mostra os gráficos de infecciosidade e número médio de parasitas por macrófago provenientes de todas as passagens estudadas, encontrados em cada animal.

#### 1x10<sup>6</sup> parasitas (1:2)



#### 5x10<sup>6</sup> parasitas (1:10)



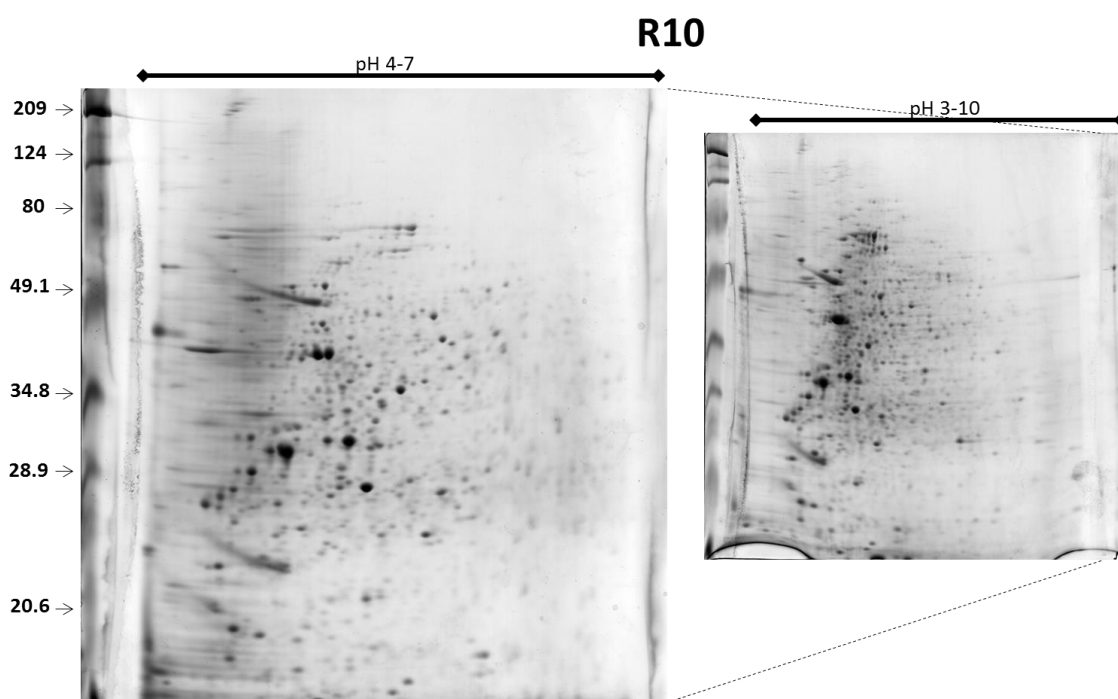
**Figura 7 – Avaliação *in vitro* da infecciosidade de *L. amazonensis* promastigota ao longo do cultivo.** Para o experimento foram utilizadas proporções de macrófago/parasita de 1:2 (gráficos de cima) e 1:10 (gráficos de baixo). Os gráficos da esquerda apresentam a porcentagem de macrófagos infectados e os gráficos da direita mostram o número médio de parasitas encontrados por macrófago em cada animal ao longo das passagens.

#### 4.4. Análise da expressão de proteínas em *L. amazonensis*

##### 4.4.1. Eletroforese bidimensional

##### 4.4.1.1. Padronização das fitas usadas na focalização

A focalização isoelétrica foi feita usando fitas de 13 cm em pH 4-7. O comprimento de 13 cm foi escolhido por proporcionar uma boa separação das proteínas por seu pI sem que os géis se tornem muito difíceis de manusear. Foram testadas duas faixas de pH: 3-10 e 4-7. A faixa mais estreita foi escolhida após se observar que a maioria dos *spots* obtidos estavam localizados nessa região (**Figura 8**). Apesar da perda de alguns *spots* localizados fora da faixa de pH 4-7, um número maior de *spots* foi recuperado devido a melhor separação obtida nessa região.



**Figura 8 – Padronização das fitas usadas para IEF do extrato de *L. amazonensis* obtido da passagem R10.** O gel a esquerda mostra a separação obtida usando uma fita de pH 4-7 e o gel a direita mostra a separação obtida usando uma fita de pH 3-10. Fitas de pH 4-7 foram selecionadas para as separações posteriores, por maximizar o número de *spots* individuais obtidos.

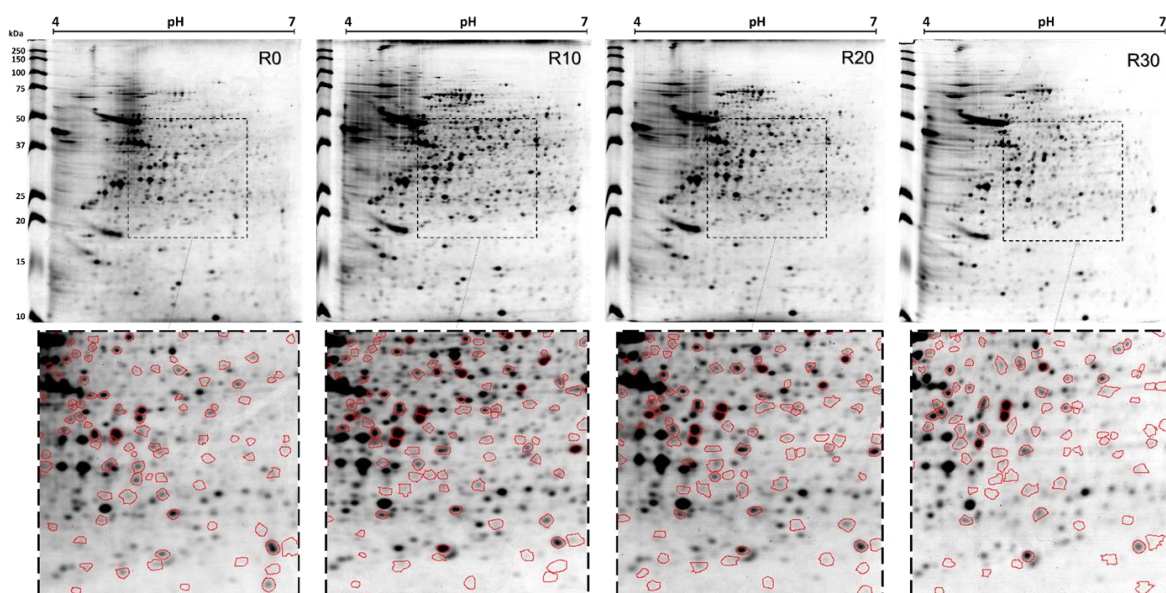
##### 4.4.1.2. Separação das proteínas usando 2-DE

Após a separação por eletroforese bidimensional das proteínas presentes nos extratos totais de *L. amazonensis*, foram encontrados em média, 837 *spots* da passagem R0; enquanto que 967, 935 e 872 *spots* foram obtidos das passagens R10, R20 e R30, respectivamente. Na **Tabela 4** estão representados os valores numéricos dos *spots* encontrados em cada gel, a média desses valores por animal e por passagem selecionada.

**Tabela 4 – Número de spots identificados a partir das análises dos géis bidimensionais.** Os géis foram feitos com extratos protéicos totais das formas promastigota em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*, após os repiques R0, R10, R20 e R30, obtidos a partir de duas garrafas de cultivo para cada um dos dois animais diferentes analisados, totalizando 4 repetições amostrais para cada passagem.

Número de spots encontrados após 2-DE					
		1 <sup>a</sup> Repetição	2 <sup>a</sup> Repetição	Média por animal	Média por passagem
R0	Animal 1	836	841	839	837
	Animal 2	834	836	835	
R10	Animal 1	964	968	966	967
	Animal 2	966	968	967	
R20	Animal 1	934	934	934	935
	Animal 2	937	933	935	
R30	Animal 1	875	870	873	872
	Animal 2	869	873	871	

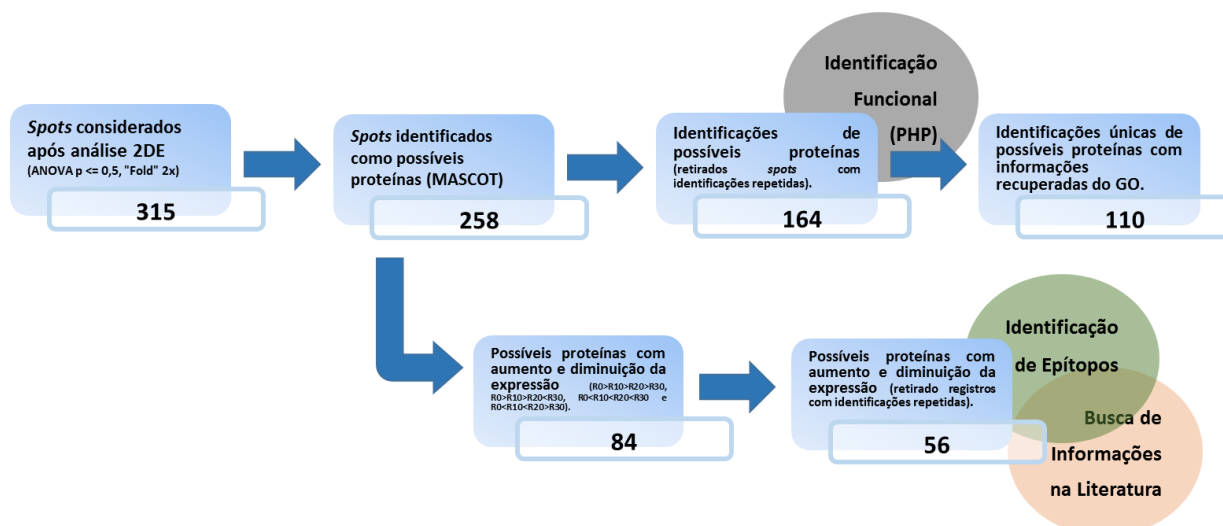
Os perfis eletroforéticos e o número de spots observados nos géis feitos com material de cada passagem apresentou boa reprodutibilidade, tanto em relação ao número total de spots, quanto às suas posições e intensidades nos quatro géis feitos para cada condição. A **Figura 9** representa um dos quatro géis feitos para cada condição. As imagens de todos os géis realizados, contendo todos os spots selecionados, estão representadas nas figuras suplementares **S1 a S4**.



**Figura 9 – Géis bidimensionais de extratos totais de promastigotas de *L. amazonensis* obtidos de diferentes passagens de cultivo.** Representado acima está um dos quatro géis bidimensionais obtidos para cada passagem de cultivo selecionada (R0, R10, R20 e R30, **Figuras suplementares S1 a S4**), após a separação dos extratos totais de parasitas nas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento. A primeira dimensão foi realizada usando fitas de pH 4-7 e a segunda dimensão por meio de SDS-PAGE 12%. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G250. A região pontilhada foi ampliada e representada na parte inferior da figura. Os spots contornados em vermelho correspondem a exemplos dos que foram encontrados pelo programa com intensidade variando entre as passagens (ANOVA,  $p < 0,01$ ,  $fold > 2$ ).

#### 4.4.2. Análise *in silico* dos dados da 2-DE e MS

Os passos seguidos para as análises dos dados obtidos por técnicas proteômicas usando bioinformática estão representados na **Figura 10**, juntamente com o número de *spots* ou proteínas considerados a partir de cada etapa.



**Figura 10 - Fluxograma – Passos seguidos para análise *in silico* dos dados obtidos por 2-DE e MS.** Os números representam a quantidade de *spots* obtidos após cada etapa.

##### 4.4.2.1. Identificação dos *spots* com variação de intensidade entre os géis das passagens selecionadas

Os perfis eletroforéticos obtidos pela separação bidimensional foram analisados pelo programa ImageMaster Platinum 7.0. Os *spots* que apresentaram variações significativas em sua intensidade (315 *spots*; ANOVA,  $p < 0,01$ ,  $fold > 2$ ) foram selecionados para a identificação por espectrometria de massa. Esses *spots* foram agrupados tendo como base diferentes condições relativas à variação de sua intensidade ao longo das passagens (**Tabela 5**).

**Tabela 5 – Condições de variação da intensidade dos spots ao longo do cultivo axênico.** Condições correspondentes a variação de intensidade dos spots nas passagens de cultivo selecionadas (R0, R10, R20 e R30) e o número de spots encontrados em cada condição.

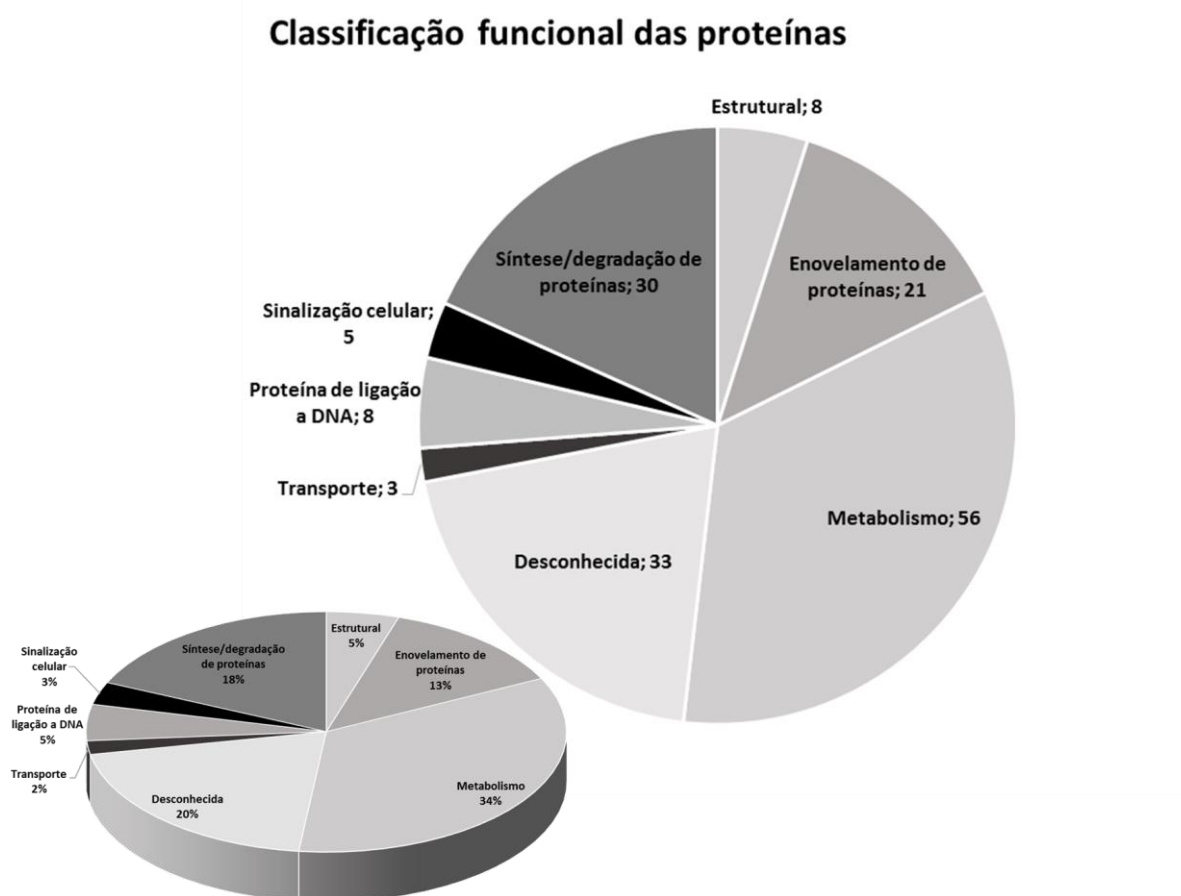
Condições	Nº de spots	Condições	Nº de spots	Condições	Nº de spots	Condições	Nº de spots	Soma Total
R0>R10>R20>R30	30	R0>R10>R20	16	R0>R10	3	R0	5	
R0>R10>R20<R30	28	R0>R10<R20	7	R0<R10	1	R10	25	
R0>R10<R20<R30	16	R0<R10<R20	0	R10>R20	5	R20	4	
R0>R10<R20>R30	31	R0<R10>R20	2	R10<R20	0	R30	3	
R0<R10<R20<R30	17	R10>R20>R30	18	R20>R30	1			
R0<R10<R20>R30	17	R10>R20<R30	13	R20<R30	0			
R0<R10>R20>R30	20	R10<R20<R30	3					
R0<R10>R20<R30	39	R10<R20>R30	11					
<b>Soma Parcial</b>	<b>198</b>	<b>Soma Parcial</b>	<b>70</b>	<b>Soma Parcial</b>	<b>10</b>	<b>Soma Parcial</b>	<b>37</b>	<b>315</b>

#### 4.4.2.2. Identificação das proteínas por Espectrometria de Massa

Dos 315 spots com variação de intensidade encontrados previamente, 258 foram identificados usando a técnica de espectrometria de massa, sendo 164 proteínas encontradas, após a exclusão das identificações duplicadas.

#### 4.4.2.3. Busca de informações importantes de cada proteína - Scripts PHP

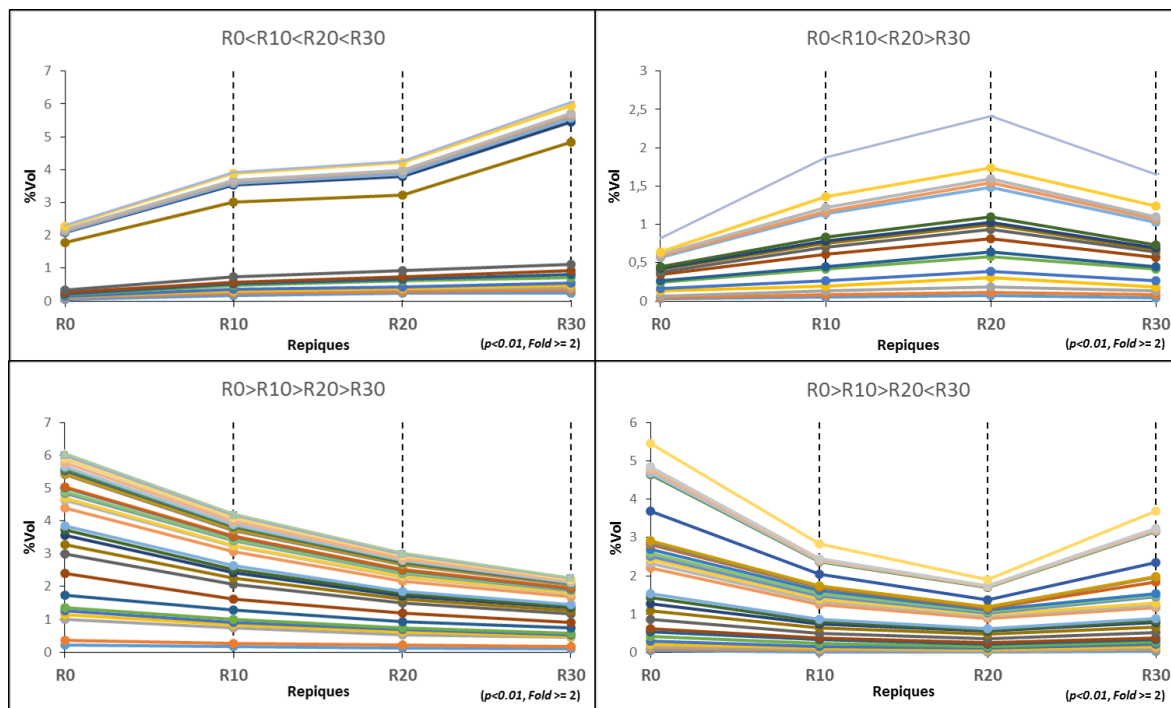
Foram elaborados scripts em linguagem PHP para extrair dados importantes sobre as 164 proteínas sugeridas pelas análises anteriores. Os dados correspondentes ao seu número de acesso (*accession number*), identificação no UniProt, sequência de resíduos de aminoácidos, função e localização subcelular foram obtidos remotamente a partir do banco de dados do NCBI, UniProt e Gene Ontology (GO). Após o uso desses scripts, foram obtidas informações sobre a função de 110 das 164 proteínas de interesse baseando-se, unicamente, em dados contidos no GO. Usando essas e outras informações adicionais obtidas pela literatura, as 164 proteínas foram agrupadas manualmente em funções globais definidas (**Figura 11**).



**Figura 11 – Representação funcional das proteínas** - Representação gráfica funcional das 164 possíveis proteínas identificadas. As proteínas foram agrupadas segundo sua função global e representados valores pontuais (gráfico da direita) e em porcentagem (gráfico da esquerda) para cada grupo.

#### 4.4.3. Seleção das proteínas baseada na condição de aumento ou diminuição da intensidade ao longo da cultura por longos períodos.

Das 164 proteínas identificadas, 56 proteínas apresentaram variação significativa da intensidade dos seus *spots* ao longo do cultivo do parasita (37 proteínas apresentaram possível diminuição, enquanto 19 possivelmente aumentaram sua expressão). Para a seleção das 56 proteínas foi considerada a estabilização da infecciosidade observada entre R20 e R30. Assim, foram selecionadas as proteínas cuja as intensidades dos *spots* variaram ao longo das passagens estudadas de acordo com as seguintes condições:  $R_0 < R_{10} < R_{20} < R_{30}$ ,  $R_0 < R_{10} < R_{20} > R_{30}$ ,  $R_0 > R_{10} > R_{20} > R_{30}$  e  $R_0 > R_{10} > R_{20} < R_{30}$  (**Figura 12**).



**Figura 12 – Representação gráfica da variação dos spots nas condições selecionadas.** A variação da intensidade ao longo do cultivo em porcentagem de volume (%V). As condições selecionadas foram R0<R10<R20<R30, R0<R10<R20>R30, R0>R10>R20>R30 e R0>R10>R20<R30. Cada linha representa o perfil de variação de um único spot.

É importante ressaltar que o número total de spots encontrados nas quatro condições selecionadas (R0<R10<R20<R30, R0<R10<R20>R30, R0>R10>R20>R30 e R0>R10>R20<R30) foi de 84 spots (**Tabela 6**). No entanto, para alguns registros de proteínas foram atribuídos mais de um spot. Para se excluir as identificações duplicadas todos os spots nessa situação foram conferidos manualmente, sendo selecionado aqueles com massa e pl mais próximos da proteína predita. Dessa maneira, foram selecionadas 56 identificações únicas.

**Tabela 6 – Condições selecionadas e número de spots encontrados em cada condição.** As condições R0<R10<R20<R30, R0<R10<R20>R30, R0>R10>R20>R30 e R0>R10>R20<R30 foram selecionadas para a busca de epítomos e dados da literatura (84 spots).

Condições selecionadas inicialmente correspondente ao possível aumento da expressão das proteínas putativas	
Condição	Nº de spots
R0<R10<R20<R30	17
R0<R10<R20>R30	14
Condições selecionadas inicialmente correspondente à possível diminuição da expressão das proteínas putativas	
Condição	Nº de spots
R0>R10>R20>R30	30
R0>R10>R20<R30	23

#### 4.5. Busca de informações e trabalhos na literatura relacionados às proteínas selecionadas

As informações sobre cada uma das 56 proteínas selecionadas foram obtidas na literatura (revisão feita em outubro de 2013). Durante a pesquisa foram anotadas informações a favor ou contra o uso das proteínas identificadas como alvos relacionados a vacinas, desenho racional de fármacos ou diagnóstico.

##### 4.5.1. Avaliação das proteínas de interesse

Entre as 37 proteínas que foram selecionadas por apresentarem uma diminuição significativa da intensidade de seus *spots* ao longo das culturas axênicas, seis foram identificadas como proteínas hipotéticas (**Tabela 7**). Entre as proteínas com funções biológicas conhecidas podem ser citadas algumas relacionadas com a virulência dos parasitas, como Proteína de choque térmico 70 (*Heat Shock Protein 70*, HSP70) (Khanra *et al.*, 2012), Proteína dissulfeto isomerase (*Protein Disulfide Isomerase*) (Achour *et al.*, 2002), Metalo-petidase da família M16 (*Metallo-peptidase M16*) (Eggleston *et al.*, 1999), Triparedoxina peroxidase (*Tryparedoxin Peroxidase*) (Iyer *et al.*, 2008); possíveis alvos para intervenções terapêuticas: S-adenosilmetionina sintetase (*S-adenosylmethionine synthetase*) (Drummelsmith *et al.*, 2004); agentes para diagnósticos: Proteína P2-2 (*60S acidic Ribosomal Protein P2-2*) (Martín *et al.*, 2009); e candidatos vacinais: fator de iniciação 4A (*Eukaryotic Initiation Factor 4A*) (Berberich *et al.*, 2003), Redutase 1 Tiol-dependente (*Thiol-dependent Reductase 1*) (Silva *et al.*, 2012). Também foram encontradas proteínas relacionadas com a motilidade do parasita: Pequena proteína miristoilada (*Small Myristoylated Protein*) (Tull *et al.*, 2010), Proteínas do *Paraflagellar rod* (*Paraflagellar Rod Protein 1D e 2C*) (Hunger-Glaser & Seebeck, 1997); e com o metabolismo do parasita: Aldeído desidrogenase (*Aldehyde Dehydrogenase*) (Feng *et al.*, 2011).

Analisando as 19 proteínas que apresentaram aumento significativo na intensidade dos seus respectivos *spots* ao longo das passagens R0 e R30, uma proteína hipotética e 18 proteínas de funções conhecidas foram identificadas (**Tabela 8**). Algumas dessas proteínas estão envolvidas com o metabolismo do parasita: Proteína Rieske (*Rieske Iron Sulfur Protein*) (Priest & Hajduk, 1996), Proteína de montagem do nucleossomo (*Nucleosome Assembly Protein*) (Scher *et al.*, 2012), 6-fosfogliconolactonase (*6-phosphogluconolactonase*) (Duclert-Savatier *et al.*, 2009); e como alvo terapêutico: Proteína 1 *Short Chain Dehydrogenase* (Celeste *et al.*, 2004).



**Tabela 7 – Identificação das proteínas que apresentaram diminuição significativa de sua expressão.** a) Valor global de identificação, número do spot correlacionado entre os géis (*spot match*) obtido após análise pelo programa ImageMaster Platinum 7.0; b) Nome da proteína identificada; c) Código de identificação no UniProt; d) Ponto Isoelétrico (pI) predito e esperado; Massa molecular (Mr em kDa) predita e esperada; f) Número de peptídeos identificados por MS constituintes da proteína identificada; g) Porcentagem de cobertura da sequência da proteína pelos peptídeos sequenciados; h) Dados normalizados com R0. Valores das médias de intensidade de cada spot em cada condição dividido pelo valor da média de intensidade do respectivo spot em R0; i) *Fold* corresponde ao maior valor médio de cada spot entre as condições dividido pelo menor valor entre as médias; j) Valor obtido após análise dos *spots* por meio do teste estatístico One-way ANOVA ( $p < 0.01$ ); l) Função biológica averiguada por auxílio dos bancos de dados NCBI, UniProt e Gene Ontology; m) Atividade biológica e/ou aplicação imunológica descrita em estudos publicados: [1] Tull *et al.*, 2010; [2] Oliveira *et al.*, 2006; [3] Daifalla *et al.*, 2011; [4] Iyer *et al.*, 2008; [5] Hunger-Glaser *et al.*, 1999; [6] Werbovetz *et al.*, 1999; [7] Feng *et al.*, 2011; [8] Niemirowicz *et al.*, 2007; [9] Hunger-Glaser *et al.*, 1997; [10] Alcolea *et al.*, 2009; [11] Bhaskar *et al.*, 2012; [12] Khanra *et al.*, 2012; [13] Berberich *et al.*, 2003; [14] Moore *et al.*, 1996; [15] Swenerton *et al.*, 2011; [16] Hummadi *et al.*, 2006; [17] Martins *et al.*, 2006; [18] Burns *et al.*, 1993; [19] Kushawaha *et al.*, 2011; [20] Misra *et al.*, 2005; [21] Bringaud *et al.*, 1995; [22] Eggleston *et al.*, 1999; [23] Mureev *et al.*, 2007; [24] Steiner *et al.*, 2007; [25] Martínez-Rodríguez *et al.*, 2012; [26] Drummelsmith *et al.*, 2004; [27] Achour *et al.*, 2002; [28] Buda *et al.*, 2013; [29] Alcolea *et al.*, 2011; [30] Martín *et al.*, 2009; [31] Silva *et al.*, 2012. As entradas com texto sem negrito correspondem às proteínas da condição R0>R10>R20>R30 e as com texto em negrito correspondem às proteínas da condição R0>R10>R20<R30.

Match ID <sup>a</sup>	Identificação <sup>b</sup>	UniProt ID <sup>c</sup>	pI (pred/esp) <sup>d</sup>	Mr (pred/esp) <sup>e</sup>	Resultados do Mascot		Valores Normalizados <sup>h</sup>				<i>Fold</i> <sup>f</sup>	1-way ANOVA p value <sup>j</sup>	Função <sup>l</sup>	Literatura <sup>m</sup>
					Nº. Match Peptídeo <sup>i</sup>	% de Cobertura <sup>g</sup>	R0	R10	R20	R30				
116	Hypothetical protein	E9AVJ0	4.65/5.63	12/55	4(1)	1	1.00	0.78	0.60	0.46	2.18	7.24E-04	Desconhecida	Desconhecida
141	Hypothetical protein	E9ANW9	4.90/4.84	15/18	2(2)	8	1.00	0.66	0.59	0.48	2.09	6.91E-03	Desconhecida	Desconhecida
142	Small myristoylated protein-3	E9APT0	4.51/4.70	15/13	6(4)	32	1.00	0.75	0.48	0.46	2.17	7.97E-07	Desconhecida	Infecciosidade <sup>1</sup>
169	Small GTP-binding protein Rab1	E9AYX8	5.36/5.54	19/22	12(8)	60	1.00	0.62	0.50	0.32	3.16	4.95E-03	Transporte	Infecciosidade <sup>2</sup>
184	Peroxidoxin	E9AW04	6.27/6.90	20/26	2(2)	6	1.00	0.78	0.45	0.42	2.40	3.24E-03	Metabolismo	Vacina <sup>3</sup>
185	Tryparedoxin Peroxidase I	Q4QF76	6.19/6.79	20/25	13(10)	21	1.00	0.75	0.56	0.48	2.10	3.08E-03	Metabolismo	Infecciosidade <sup>4</sup>
260	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative	E9AT73	5.44/6.77	28/45	6(4)	12	1.00	0.80	0.63	0.38	2.66	4.90E-03	Metabolismo	Infecciosidade <sup>5</sup>
291	α-tubulin	E9AP62	5.33/5.45	31/61	24(22)	31	1.00	0.81	0.58	0.47	2.13	7.89E-06	Estrutural	Infecciosidade <sup>6</sup>
312	Aldehyde dehydrogenase	E9AXJ1	6.67/7.52	34/55	2(1)	11	1.00	0.62	0.43	0.43	2.35	2.24E-05	Metabolismo	Metabolismo <sup>7</sup>
336	Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32	E9B493	5.26/5.51	36/57	19(8)	23	1.00	0.81	0.59	0.44	2.30	3.67E-06	Síntese de proteínas	Infecciosidade <sup>8</sup>
388	Parafagellar rod protein 1D	E9ALP7	5.34/5.36	44/69	12(7)	16	1.00	0.89	0.62	0.37	2.73	1.52E-04	Estrutural	Infecciosidade <sup>9</sup>
412	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8	E9AUD5	4.05/5.64	48/82	4(3)	4	1.00	0.44	0.37	0.27	3.68	4.87E-03	Síntese de proteínas	Metabolismo <sup>10</sup>
615	Hypothetical protein	E9ASM0	6.61/7.09	27/147	1(1)	0	1.00	0.88	0.63	0.37	2.68	9.05E-03	Desconhecida	Desconhecida
640	Actin	P45520	5.85/5.40	34/42	4(2)	13	1.00	0.51	0.40	0.18	5.49	6.49E-03	Estrutural	Metabolismo <sup>11</sup>
646	Heat shock 70 kDa protein	Q07437	4.88/6.05	39/45	13(11)	14	1.00	0.78	0.40	0.37	2.73	1.56E-03	Enovelamento de proteínas	Infecciosidade <sup>12</sup>
653	Eukaryotic initiation factor 4A	O62591	4.65/5.83	42/45	8(4)	13	1.00	0.99	0.85	0.38	2.60	9.39E-03	Síntese de proteínas	Vacina <sup>13</sup>
656	Parafagellar rod protein 2C	E9AQV6	5.18/5.73	43/77	4(1)	5	1.00	0.66	0.37	0.37	2.69	1.57E-04	Estrutural	Infecciosidade <sup>14</sup>
697	Hypothetical protein	E9B489	5.27/5.36	25/36	1(1)	4	1.00	0.60	0.55	0.41	2.45	1.47E-03	Desconhecida	Desconhecida
776	Enolase	E9APW3	5.80/5.48	30/47	4(3)	13	1.00	0.58	0.45	0.36	2.81	9.87E-04	Metabolismo	Infecciosidade <sup>15</sup>
69	Glutamine synthetase	E9AKR5	5.81/5.71	38/43	4(3)	12	1.00	0.82	0.50	1.57	3.17	2.29E-05	Metabolismo	Vacina <sup>16</sup>
76	Malic enzyme	E9AWR7	5.01/5.79	39/63	13(8)	18	1.00	0.81	0.32	0.57	3.09	2.85E-04	Metabolismo	Vacina <sup>17</sup>
77	Putative phosphatase 2C	E9B0G2	4.96/4.93	41/43	8(7)	20	1.00	0.51	0.33	0.68	2.99	1.22E-03	Sinalização Celular	Infecciosidade <sup>18</sup>

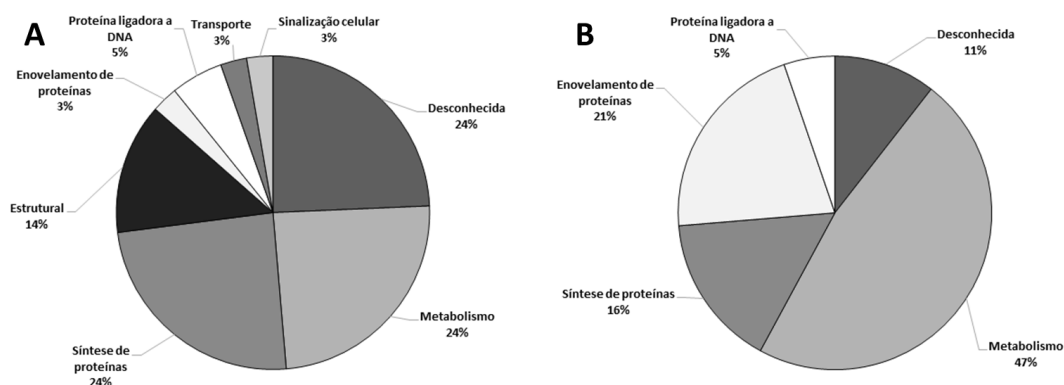
107	Elongation factor 2	E9ASD6	6.03/5.77	12/95	1(1)	1	1.00	0.53	0.48	0.58	2.07	5.56E-03	Síntese de proteínas	Vacina <sup>19</sup>
125	Endoribonuclease L-PSP (pb5)	E9AW21	5.86/5.52	13/17	2(2)	9	1.00	0.72	0.45	0.60	2.22	1.98E-03	Proteína de ligação a DNA	Terapêutico <sup>20</sup>
149	Ribonucleoprotein p18	E9AQ29	5.09/5.55	16/22	4(0)	15	1.00	0.55	0.41	0.64	2.43	2.12E-04	Proteína de ligação a DNA	Metabolismo <sup>21</sup>
210	Hypothetical protein	E9AXT3	5.64/5.64	23/31	13(9)	29	1.00	0.61	0.50	0.59	2.01	1.10E-04	Metabolismo	Desconhecida
211	Hypothetical protein	E9B549	4.37/9.90	23/23	5(5)	25	1.00	0.51	0.47	0.58	2.12	1.56E-03	Desconhecido	Desconhecida
235	Metallo-peptidase. Clan ME. Family M16	E9B2A8	6.64/5.06	25/120	1(1)	1	1.00	0.64	0.47	0.65	2.15	1.43E-04	Síntese de proteínas	Infecciosidade <sup>22</sup>
239	β-tubulin	E9AMJ8	4.61/5.95	25/47	20(15)	32	1.00	0.56	0.38	0.42	2.64	2.64E-05	Estrutural	Infecciosidade <sup>23</sup>
262	Chain A. Open And Closed Structures Of The Udp-Glucose Pyrophosphorylase From <i>Leishmania Major</i>	Q4QDU3	4.92/5.84	28/56	2(1)	2	1.00	0.65	0.49	0.62	2.03	8.46E-03	Metabolismo	Metabolismo <sup>24</sup>
296	Peptidase m20/m25/m40 family-like protein	E9B1Y8	5.04/5.10	32/38	5(5)	15	1.00	0.71	0.43	0.56	2.34	5.10E-04	Síntese de proteínas	Metabolismo <sup>25</sup>
308	S-adenosylmethionine synthetase	E9B1C6	5.12/5.42	34/44	9(5)	16	1.00	0.91	0.58	1.71	2.97	3.36E-03	Metabolismo	Metabolismo <sup>26</sup>
381	Protein disulfide isomerase	E9AUD1	5.06/5.04	42/53	12(7)	22	1.00	0.90	0.44	0.61	2.29	1.05E-03	Metabolismo	Infecciosidade <sup>27</sup>
519	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	E9ATH0	5.14/5.21	35/39	7(5)	14	1.00	0.42	0.32	2.92	9.02	2.13E-10	Síntese de proteínas	Metabolismo <sup>28</sup>
584	Basic transcription factor 3a	E9ATF9	4.00/9.44	13/12	1(1)	15	1.00	0.37	0.24	0.46	4.13	6.69E-04	Síntese de proteínas	Metabolismo <sup>29</sup>
586	60S acidic ribosomal protein P2-2	Q06382	4.04/4.23	13/11	8(8)	52	1.00	0.35	0.34	0.86	2.96	2.51E-03	Síntese de proteínas	Infecciosidade <sup>30</sup>
606	Thiol-dependent reductase 1	E9B3K3	6.38/5.65	24/46	3(2)	12	1.00	0.38	0.22	0.47	4.63	1.71E-05	Desconhecido	Vacina <sup>31</sup>

**Tabela 8 - Identificação das proteínas que apresentaram aumento significativo de sua expressão.** a) Valor global de identificação, número do spot correlacionado entre os géis (*spot match*) obtido após análise pelo programa ImageMaster Platinum 7.0; b) Nome da proteína identificada; c) Código de identificação no UniProt; d) Ponto Isoelétrico (pI) predito e esperado; Massa molecular (Mr em kDa) predita e esperada; f) Número de peptídeos identificados por MS constituintes da proteína identificada; g) Porcentagem de cobertura da sequência da proteína pelos peptídeos sequenciados; h) Dados normalizados com R0. Valores das médias de intensidade de cada spot em cada condição dividido pelo valor da média de intensidade do respectivo spot em R0; i) *Fold* corresponde ao maior valor médio de cada spot entre as condições dividido pelo menor valor entre as médias; j) Valor obtido após análise dos *spots* por meio do teste estatístico One-way ANOVA ( $p < 0.01$ ); l) Função biológica averiguada por auxílio dos bancos de dados NCBI, UniProt e Gene Ontology; m) Atividade biológica e/ou aplicação imunológica descrita em estudos publicados: [1] Joshi *et al.*, 1996; [2] Tielens *et al.*, 2010; [3] Jensen *et al.*, 2001; [4] Priest *et al.*, 1996; [5] Soto *et al.*, 1996; [6] Lackovic *et al.*, 2010; [7] Scher *et al.*, 2012; [8] Sánchez-Cañete *et al.*, 2009; [9] Peris *et al.*, 1994; [10] Steiner *et al.*, 2007; [11] Jaramillo *et al.*, 2011; [12] Liu *et al.*, 2011; [13] Casanova *et al.*, 2008; [14] Celeste *et al.*, 2004; [15] Bakker-Grunwald, 1992; [16] Leblanc *et al.*, 1998; [17] Banerjee *et al.*, 2006; [18] Duclert-Savatier *et al.*, 2009. As entradas com texto sem negrito corresponde as proteínas da condição R0>R10>R20>R30 e as com texto em negrito corresponde às proteínas da condição R0>R10>R20<R30.

Match ID <sup>a</sup>	Identificação <sup>b</sup>	UniProt ID <sup>c</sup>	pI (pred/esp) <sup>d</sup>	Mr (pred/esp) <sup>e</sup>	Nº. Match Peptídeo <sup>f</sup>	% de Cobertura <sup>g</sup>	Resultados do Mascot				Valores Normalizados <sup>h</sup>		1-way ANOVA <i>p</i> value <sup>j</sup>	Função <sup>l</sup>	Literatura <sup>m</sup>
							R0	R10	R20	R30	<i>Fold</i> <sup>i</sup>				
8	Calreticulin	E9B259	4.52/4.51	50/45	3(3)	5	1.00	3.26	4.40	4.49	4.49	6.96E-03	Enovelamento de proteínas	Metabolismo <sup>1</sup>	
12	Isocitrate dehydrogenase	E9B494	5.44/5.51	40/47	16(6)	28	1.00	1.71	1.76	2.51	2.51	2.41E-03	Metabolismo	Metabolismo <sup>2</sup>	
303	60S acidic ribosomal subunit protein	E8NHJ8	5.07/5.00	33/35	26(21)	45	1.00	3.15	4.72	4.75	4.75	9.76E-05	Síntese de proteínas	Diagnóstico <sup>3</sup>	
326	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	E9AW11	5.67/5.29	36/42	10(7)	23	1.00	2.07	2.25	3.24	3.24	1.72E-04	Metabolismo	Metabolismo <sup>4</sup>	
392	Nucleosome assembly protein	E9ARZ6	4.64/4.64	45/40	17(9)	25	1.00	2.17	2.49	2.61	2.61	1.78E-04	Proteína ligadora a DNA	Metabolismo <sup>5</sup>	
420	ATPase beta subunit	E9AXJ6	5.02/5.14	49/56	60(51)	49	1.00	1.74	1.89	2.02	2.02	9.55E-04	Metabolismo	Metabolismo <sup>6</sup>	
432	T-complex protein 1. theta subunit	E9AUC7	5.27/5.24	54/59	27(18)	49	1.00	1.54	2.05	3.35	3.35	3.65E-04	Enovelamento de proteínas	Metabolismo <sup>7</sup>	
458	Chain A. Protein Structure Of Usp From <i>L. Major</i> in Apo-Form	D3G6S4	5.36/5.34	63/69	4(4)	3	1.00	1.82	3.11	3.24	3.24	2.57E-03	Metabolismo	Metabolismo <sup>8</sup>	
739	Hs1vu complex proteolytic subunit-like.hs1vu complex proteolytic subunit-like. threonine peptidase. Clan T(1). family T1B	E9AT11	5.24/6.09	22/25	4(1)	9	1.00	1.65	1.87	2.05	2.05	3.70E-04	Síntese de proteínas	Metabolismo <sup>9</sup>	
767	6-phosphogluconolactonase	E9AYQ1	5.50/5.22	26/29	2(2)	8	1.00	1.39	1.71	2.27	2.27	1.63E-03	Metabolismo	Metabolismo <sup>10</sup>	
<b>40</b>	<b>Heat shock protein 83; HSP 83</b>	<b>P27741</b>	<b>6.27/5.00</b>	<b>31/81</b>	<b>1(1)</b>	<b>1</b>	<b>1.00</b>	<b>1.88</b>	<b>2.92</b>	<b>2.83</b>	<b>2.92</b>	<b>3.76E-03</b>	<b>Enovelamento de proteínas</b>	<b>Diagnóstico<sup>11</sup></b>	
<b>62</b>	<b>2-hydroxy-3-oxopropionate reductase</b>	<b>E9B0E2</b>	<b>5.77/5.40</b>	<b>26/31</b>	<b>6(5)</b>	<b>25</b>	<b>1.00</b>	<b>2.39</b>	<b>3.73</b>	<b>2.42</b>	<b>3.73</b>	<b>6.53E-05</b>	<b>Metabolismo</b>	<b>Metabolismo<sup>12</sup></b>	
<b>230</b>	<b>Short chain dehydrogenase</b>	<b>E9B602</b>	<b>6.57/6.31</b>	<b>25/28</b>	<b>3(1)</b>	<b>9</b>	<b>1.00</b>	<b>2.16</b>	<b>2.61</b>	<b>2.31</b>	<b>2.61</b>	<b>8.48E-04</b>	<b>Metabolismo</b>	<b>Terapêutico<sup>13</sup></b>	
<b>279</b>	<b>Rieske iron-sulfur protein precursor</b>	<b>E9B632</b>	<b>5.57/6.02</b>	<b>29/34</b>	<b>9(7)</b>	<b>43</b>	<b>1.00</b>	<b>1.83</b>	<b>2.43</b>	<b>1.89</b>	<b>2.43</b>	<b>6.34E-06</b>	<b>Metabolismo</b>	<b>Metabolismo<sup>14</sup></b>	
<b>327</b>	<b>Vacuolar ATPase subunit-like protein</b>	<b>E9AKM1</b>	<b>4.93/4.85</b>	<b>36/42</b>	<b>13(5)</b>	<b>25</b>	<b>1.00</b>	<b>1.75</b>	<b>2.39</b>	<b>1.39</b>	<b>2.39</b>	<b>3.74E-03</b>	<b>Metabolismo</b>	<b>Metabolismo<sup>15</sup></b>	
<b>510</b>	<b>Cyclin 1</b>	<b>E9AMR1</b>	<b>5.99/5.67</b>	<b>31/36</b>	<b>3(1)</b>	<b>13</b>	<b>1.00</b>	<b>2.26</b>	<b>2.28</b>	<b>1.78</b>	<b>2.28</b>	<b>8.78E-03</b>	<b>Síntese de proteínas</b>	<b>Metabolismo<sup>16</sup></b>	
<b>529</b>	<b>Transport protein Sec13</b>	<b>E9B2C5</b>	<b>5.69/5.51</b>	<b>34/37</b>	<b>2(1)</b>	<b>9</b>	<b>1.00</b>	<b>2.45</b>	<b>3.00</b>	<b>1.85</b>	<b>3.00</b>	<b>2.79E-03</b>	<b>Desconhecida</b>	<b>Metabolismo<sup>17</sup></b>	
<b>676</b>	<b>Hypothetical protein</b>	<b>E9ATK7</b>	<b>4.98/4.91</b>	<b>98/119</b>	<b>33(22)</b>	<b>27</b>	<b>1.00</b>	<b>1.75</b>	<b>3.75</b>	<b>2.80</b>	<b>3.75</b>	<b>3.84E-03</b>	<b>Desconhecida</b>	<b>Desconhecida</b>	
<b>735</b>	<b>Glucose-regulated protein 78; GRP78</b>	<b>E9AZT9</b>	<b>5.15/5.18</b>	<b>67/72</b>	<b>27(22)</b>	<b>28</b>	<b>1.00</b>	<b>4.69</b>	<b>4.84</b>	<b>4.67</b>	<b>4.84</b>	<b>9.57E-05</b>	<b>Enovelamento de proteínas</b>	<b>Vacina<sup>18</sup></b>	

#### 4.6. Correlação das proteínas identificadas aos processos celulares – GO Database

Com o auxílio das informações contidas no banco de dados do GO, as proteínas foram correlacionadas a eventos celulares conforme sua função e de acordo com aumento ou diminuição de sua expressão ao longo do cultivo (**Figura 13**).

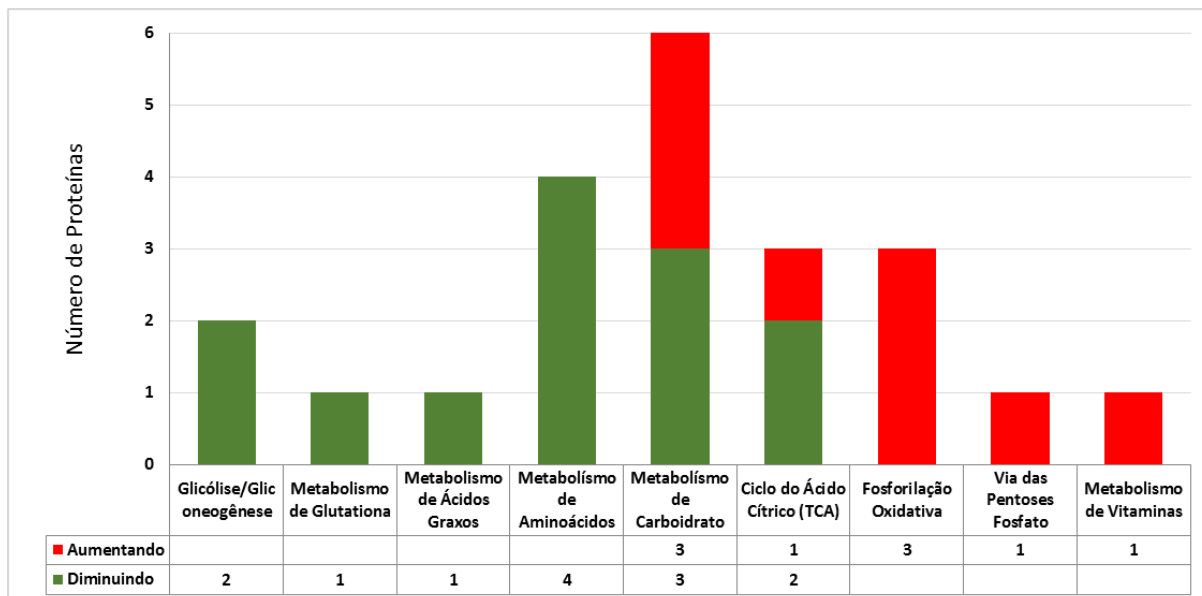


**Figura 13 – Distribuição funcional das proteínas selecionadas no estudo proteômico.** Em **A** é mostrada a porcentagem da distribuição funcional das 37 proteínas que apresentaram diminuição de expressão ao longo dos repiques e, em **B**, a porcentagem da distribuição funcional das 19 proteínas que apresentaram aumento da expressão.

Proteínas relacionadas ao metabolismo e à síntese de proteínas apresentaram grande destaque tanto para condição de aumento, quanto para a de diminuição, assim como proteínas com função desconhecida. Além disso, foram identificadas quatro proteínas relacionadas ao enovelamento protéico com possível aumento de sua expressão e apenas uma relacionada a essa função com possível diminuição da expressão ao longo dos repiques.

#### 4.7. Correlação das proteínas de interesse com eventos metabólicos – KEGG database

As proteínas previamente selecionadas, envolvidas com metabolismo, foram analisadas usando o banco de dados KEGG, e separadas, baseando-se no principal evento metabólico no qual estão envolvidas (**Figura 14**).



**Figura 14 – Distribuição das proteínas de acordo com sua função metabólica.** As proteínas identificadas anteriormente com envolvimento no metabolismo foram agrupadas de acordo com o evento metabólico. As proteínas foram separadas usando o banco de dados KEGG, sendo que aquelas com aumento de expressão ao longo dos repiques estão representadas no gráfico em vermelho, e as que apresentaram diminuição de expressão estão representadas em verde. A tabela situada na posição inferior do gráfico representa o número de proteínas encontradas em cada evento.

Entre as proteínas envolvidas com processos metabólicos apresentadas na **figura 14**, *Enolase* e *Aldehyde dehydrogenase* estão envolvidas em mais de um processo. As duas proteínas foram correlacionadas com a glicólise/gliconeogênese, sendo a *Aldehyde dehydrogenase* também envolvida com o metabolismo de ácidos graxos. Em relação ao metabolismo de glutamina a Peroxidoxina (*Peroxidoxin*), com expressão diminuindo ao longo do cultivo, foi correlacionada a esse processo pelas informações do KEGG. As proteínas envolvidas com Metabolismo de aminoácidos foram a *Aldehyde dehydrogenase*, a *Enolase*, a Glutamina-sintetase (*Glutamine synthetase*) e a *S-adenosylmethionine synthetase*, todas com possível diminuição da expressão ao longo do cultivo do parasita. Relacionadas com metabolismo de carboidratos, além da *Aldehyde dehydrogenase*, estão as proteínas UDP-Glicose pirofosforilase (*UDP-Glucose Pyrophosphorylase*, *Chain A Open And Closed Structures Of The Udp-Glucose Pyrophosphorylase*) e Enzima málica (*Malic enzyme*), com expressão diminuindo, e as proteínas USP (*UDP sugar pyrophosphorylase*), Proteína Manose 1-fosfato guaniltransferase (*Mannose-1-phosphate guanyltransferase*), 2-hidroxi-3-oxo-propionato redutase (*2-hydroxy-3-oxopropionate reductase*), com expressão possivelmente aumentando ao longo do cultivo.

As proteínas Isocitrato desidrogenase (*Isocitrate dehydrogenase*), com expressão aumentando, *Malic enzyme* e Succinil-CoA ligase (*Succinyl-CoA ligase*), com expressão diminuindo ao longo do cultivo foram relacionadas ao ciclo do ácido

cítrico. As proteínas *Rieske iron-sulfur protein*, subunidade beta da ATPase (*ATPase beta subunit*) e *Vacuolar ATPase*, com expressão possivelmente aumentando ao longo do cultivo, foram correlacionadas com a fosforilação oxidativa. A *6-phosphogluconolactonase* foi a única proteína correlacionada com a via das pentoses fosfato apresentando aumento da expressão ao longo do cultivo axênico de *L. amazonensis*. A *Short chain dehydrogenase* foi correlacionada com a síntese de vitamina e a proteína *disulfide isomerase*, apesar de ser definida pelas informações do GO como componente metabólico, não foi correlacionada pelo KEGG a um evento metabólico específico. Essa proteína atua no processamento protéico dentro do retículo endoplasmático, realizando a formação e quebra das pontes dissulfeto, participando no enovelamento de proteínas e nos processos redox da célula (Wang & Tsou, 1993).

#### 4.8. Predição de antigenicidade das proteínas

Uma análise prévia foi feita a fim de se verificar quantas das 56 proteínas selecionadas já haviam sido avaliadas em trabalhos científicos quanto a sua atuação como candidato vacinal. Entre as proteínas cujo spot correspondente diminuiu de intensidade no decorrer das condições estudadas, a proteína *60S acidic Ribosomal Protein P2-2* (Priest *et al.*, 2010), a *Thiol-dependent reductase 1* (Silva *et al.*, 2012), a *S-adenosylmethionine Synthetase* (Simo *et al.*, 2010), o Fator de iniciação da transcrição 3 (*Eukaryotic translation initiation factor 3*) (González *et al.*, 2009), a *Tryparedoxin Peroxidase* (Jayakumar *et al.*, 2011), a Metallo-peptidase da família M32 (*Metallo-peptidase, ClanMA(E), Family M32*) (Frasch *et al.*, 2012), o Fator de iniciação 4A (*Eukaryotic initiation factor 4A - eIF4A*) (Barhoumi *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2001) e a HSP70 (Carrión *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2011) são exemplos de proteínas já identificadas por outros estudos com propriedades antigênicas. Outras proteínas identificadas nesse trabalho com possível aumento da expressão ao longo do cultivo axênico que já apresentam estudos relacionados ao seu potencial antigênico são a Proteína ácida ribossomal 60S (*60S acidic ribosomal subunit*) (Iborra *et al.*, 2005), a *ATPase beta subunit* (Dea-Ayuela *et al.*, 2006), a Calreticulina (*Calreticulin*) (Wu *et al.*, 2013), a *Isocitrate dehydrogenase* (Hussain *et al.*, 2008), a *Vacuolar ATPase (Vacuolar ATPase subunit-like protein)* (Stober *et al.*, 2006), a Proteína 78 regulada por glicose (*Glucose regulated protein 78*) (Jensen *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2001), a desidrogenase de cadeia curta (*Short Chain Dehydrogenase*) (Puah *et al.*, 2013; Ko *et al.*, 2012) e a Proteína de choque térmico 83 (*Heat Shock Protein 83 – HSP83*) (Celeste *et al.*, 2004).

A partir dessa análise, 31 das 56 proteínas foram selecionadas para a predição de antigenicidade, por ainda não terem sido avaliadas como potenciais alvos vacinais (**Tabela 9**).

A predição da antigenicidade das proteínas foi feita por ferramentas do servidor *SCRATCH PROTEIN PREDITOR* (**Seção 3.11**). Além da antigenicidade da proteína, o programa fornece informações preditas sobre epitopos específicos para LB, informações sobre estrutura secundária, acessibilidade do solvente, entre outras. Predições de antigenicidade protéica acima de 50% (>0,50), preditos para 19 das 31 proteínas, podem indicar bons alvos vacinais para serem estudados *in vivo*.

Também foi utilizado o programa HLA *Peptide Binding Predictions* (**Seção 3.12**) para a predição de epítomos contra LT citotóxicos, usando a sequência de aminoácidos das proteínas. Utilizando essa abordagem, foram obtidos 183 peptídeos com nove resíduos de aminoácidos provenientes das 31 proteínas selecionadas, apresentados por MHC-I de C57BL/6 e 138 peptídeos apresentados por MHC-I de BALB/c (**Tabela 9**).

**Tabela 9 – Análise e Predição de Proteínas Antigênicas pelo servidor SCRATCH e pelo programa HLA Peptide Binding Predictions.** a) Valor global de identificação, número do spot correlacionado entre os géis (*spot match*) obtido após análise pelo programa ImageMaster Platinum 7.0; b) Nome da proteína identificada; c) *Fold* corresponde ao maior valor médio de cada spot entre as condições dividido pelo menor valor entre as médias. Às condições onde a intensidade do spot está diminuindo ao longo do cultivo foi adicionado um sinal de negativo à frente do valor; d) Código de identificação no UniProt; e) Condição representativa da variação da intensidade dos spots ao longo das passagens R0, R10, R20, R30; f) Probabilidade da proteína inteira apresentar características antigênicas. Dado predito pelo servidor SCRATCH, ferramenta ANTIGENpro, sendo representada por valores de 0 a 1 onde 1 corresponde a uma proteína com 100% de probabilidade de antigenicidade; g) Número de peptídeos antigênicos de 9 resíduos preditos pelo programa HLA Peptide Binding Predictions, localizados dentro da sequência de aminoácido de cada proteína. A predição foi feita utilizando alelos codificantes de MHC-I das linhagens C57BL/6 (Db) e BALB/c (Dd).

Match ID <sup>a</sup>	Identificação <sup>b</sup>	Fold <sup>c</sup>	ID UniProt <sup>d</sup>	Condição <sup>e</sup>	Probabilidade Antigênica <sup>f</sup>	Nº de Peptídeos <sup>g</sup>	
						Db	Dd
69	Glutamine synthetase	-3,17	E9AKR5	R0>10>20<30	0,78	6	5
76	Malic enzyme	-3,09	E9AWR7	R0>10>20<30	0,42	11	10
77	Putative phosphatase 2C	-2,99	E9B0G2	R0>10>20<30	0,86	8	4
116	Hypothetical protein	-2,18	E9AVJ0	R0>10>20>30	0,83	1	3
125	Endoribonuclease L-PSP (pb5)	-2,22	E9AW21	R0>10>20<30	0,70	3	1
141	Hypothetical protein	-2,09	E9ANW9	R0>10>20>30	0,86	1	1
142	Small myristoylated protein-3	-2,17	E9APT0	R0>10>20>30	0,79	0	0
169	Small GTP-binding protein Rab1	-3,16	E9AYX8	R0>10>20>30	0,86	3	2
184	Peroxidoxin	-2,40	E9AW04	R0>10>20>30	0,58	1	4
210	Hypothetical protein	-2,01	E9AXT3	R0>10>20<30	0,57	6	3
211	Hypothetical protein	-2,12	E9B549	R0>10>20<30	0,72	2	2
235	Metallo-peptidase. Clan ME. Family M16	-2,15	E9B2A8	R0>10>20<30	0,33	14	4

296	Peptidase m20/m25/m40 family-like protein	-2,34	E9B1Y8	R0>10>20<30	0,78	8	4
308	S-adenosylmethionine synthetase	-2,97	E9B1C6	R0>10>20<30	0,34	2	4
312	Aldehyde dehydrogenase	-2,35	E9AXJ1	R0>10>20>30	0,39	6	9
336	Metallo-peptidase. Clan MA(E). Family M32	-2,30	E9B493	R0>10>20>30	0,49	7	6
584	Basic transcription factor 3a	-4,13	E9ATF9	R0>10>20<30	0,68	0	0
615	Hypothetical protein	-2,68	E9ASM0	R0>10>20>30	0,29	16	10
697	Hypothetical protein	-2,45	E9B489	R0>10>20>30	0,37	2	3
62	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	3,73	E9B0E2	R0<10<20>30	0,45	4	2
279	Rieske iron-sulfur protein precursor	2,43	E9B632	R0<10<20>30	0,80	6	1
326	Mannose-1-phosphate guanyltransferase	3,24	E9AW11	R0<10<20<30	0,31	8	5
392	Nucleosome assembly protein	2,61	E9ARZ6	R0<10<20<30	0,84	1	1
420	ATPase beta subunit	2,02	E9AXJ6	R0<10<20<30	0,41	6	7
432	T-complex protein 1. theta subunit	3,35	E9AUC7	R0<10<20<30	0,59	10	6
458	Chain A. Protein Structure Of Usp From L. Major in Apo-Form	3,24	D3G6S4	R0<10<20<30	0,31	12	11
510	Cyclin 1	2,28	E9AMR1	R0<10<20>30	0,50	2	5
529	Transport protein Sec13	3,00	E9B2C5	R0<10<20>30	0,75	3	9
676	Hypothetical protein	3,75	E9ATK7	R0<10<20>30	0,50	28	13
739	Hs1vu complex proteolytic subunit-like.hs1vu complex proteolytic subunit-like. threonine peptidase. Clan T(1). family T1B	2,05	E9AT11	R0<10<20<30	0,75	1	0
767	6-phosphogluconolactonase	2,27	E9AYQ1	R0<10<20<30	0,14	5	3

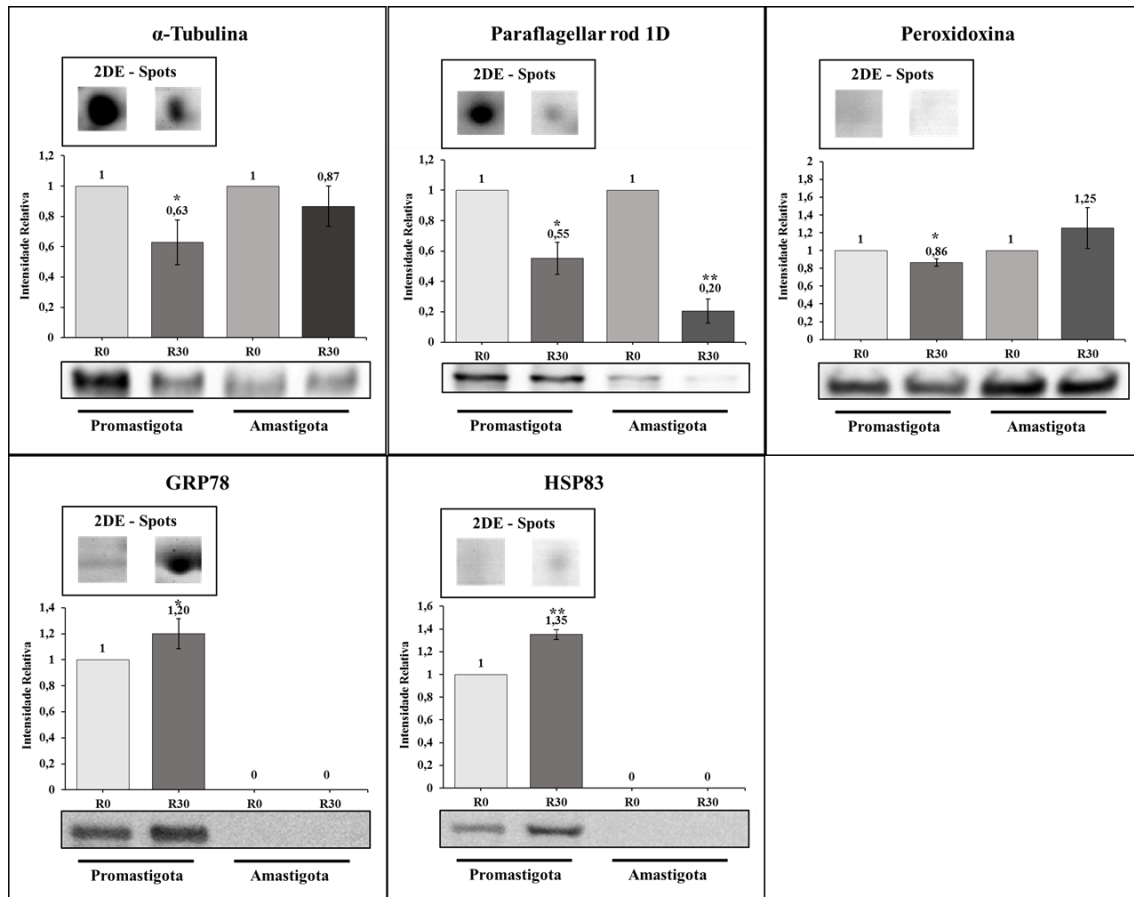
#### 4.9. Validação das proteínas por *immunoblotting*

As proteínas *Peroxidoxin*, *Paraflagellar rod protein*,  $\alpha$ -*Tubulin*, HSP83 e GRP78 foram validadas por *Immunoblotting* (Figura 15). As proteínas do citoesqueleto do parasita (*Paraflagellar rod protein* e  $\alpha$ -*Tubulin*) apresentaram um queda de expressão, assim como observado para a *Peroxidoxin*, indicando a participação dessas proteínas na redução da capacidade infectiva do parasita. Mudanças na expressão de proteínas de choque térmico também ocorrem, sendo que seu aumento pode estar associado com a resposta a uma possível ocorrência de estresse celular em *L. amazonensis*.

Complementando as análises por *Immunoblotting*, as mudanças na expressão das proteínas foi avaliada nas formas amastigotas-like, obtidas das passagens de R0 e R30. As análises foram feitas comparando-se o aumento ou diminuição da expressão protéica nos parasitas amastigotas-like (R30) em relação à expressão nas formas derivadas de R0. Como resultado, não foi observada expressão das proteínas



HSP83 e GRP78 nos parasitas diferenciados axenicamente. A *Peroxidoxin* apresentou um aumento na expressão na forma amastigota (R30), enquanto que *Paraflagellar rod protein* e  $\alpha$ -*Tubulin* tiveram uma diminuição da expressão (**Figura 15**).



**Figura 15 – Validação por *Immunoblotting* de proteínas de *L. amazonensis* identificadas após análise por 2-DE.** *Immunoblotting* representativo de algumas proteínas que apresentaram um aumento ou uma diminuição significativa de expressão ao longo das passagens R0 e R30 de *L. amazonensis* nas formas promastigota e amastigota-like. Para cada proteína ( $\alpha$ -*Tubulin*, *Paraflagellar rod protein* 1D, *Peroxidoxin*, GRP78 e HSP83) foi apresentado um exemplo do spot correspondente obtidos na 2-DE após a separação do extrato total da forma promastigota do parasita obtida das passagens R0 e R30. O asterisco representa a comparação da expressão das proteínas entre as condições R0 e R30 das formas promastigota e amastigota-like após aplicação do teste t de Student ( $p < 0,05$ ) e os números representam a variação relativa de cada proteína em comparação com o R0. As imagens da coloração com Ponceau S para cada membrana foram utilizadas como padrão de *loading* para normalização. Os *Immunoblotting* foram feitos em triplicata e o valor relativo corresponde às médias desses resultados.

## 5. Discussão

### 5.1. Variação da infecciosidade dos parasitas

A comparação entre as formas amastigotas de *L. donovani*, desenvolvidas no organismo do hospedeiro, e as formas amastigotas-like, cultivadas de maneira axênica, demonstram diferenças na morfologia e tamanho da célula e uma acentuada diminuição de virulência em *L. donovani* após cultivos axênicos (Pescher *et al.*, 2011). É importante ressaltar que a manutenção da morfologia das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* ao longo do cultivo, observada na **Figura 6**, indica que a diminuição da infecciosidade ao longo dos repiques dos parasitas não está relacionada com uma mudança morfológica, ou com uma diferenciação do parasita a outras formas do ciclo de vida, mas possivelmente com um controle de vias de sinalização, ainda pouco conhecido.

Alguns estudos tem mostrado que a manutenção de *Leishmania* em culturas axênicas por longos períodos constitui um fator importante na redução da infecciosidade de *L. infantum* (Grimm *et al.*, 1991) e *L. major* (Segovia *et al.*, 1992). Em 1984, Mitchell e colaboradores já utilizavam o método de cultivo axênico para a produção de cepas menos infectivas de *L. major*. Segovia (1992) relatou que a diminuição de virulência pode ser mediada por uma baixa pressão seletiva durante o cultivo ou por problemas de adaptação ao meio de cultura, fenômeno similar à seleção clonal. Moreira e colaboradores (2012) mostraram que a diminuição de virulência de *L. infantum*, após cultivo axênico por longo período, pode ser devido à inabilidade de parasitas na forma promastigota de se diferenciarem adequadamente à forma amastigota. Diante de várias sugestões sobre fatores ambientais responsáveis pela diminuição da virulência do parasita cultivados por longos períodos, e diante do desconhecimento sobre os elementos celulares do parasita responsáveis por esse evento, essa tese teve como principal objetivo identificar elementos protéicos capazes de modular a capacidade infectiva das formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis* em cultura.

Um aumento da infecciosidade das formas promastigotas de *Leishmania* spp. é observada quando os parasitas passam da fase logarítmica (dias 1 a 3) para a fase estacionária (dias 4 a 6) no seu ciclo de crescimento *in vitro* (Walker *et al.*, 2006; Bates, 1994; Da Silva & Sacks, 1987; Sacks & Perkins, 1984). Para *L. amazonensis*, foi observado que a porcentagem de promastigotas em fase estacionária encontrados em todas as culturas foi homogênea, sugerindo que as mudanças relacionadas ao

perfil de expressão protéica e aos valores de infecciosidade do parasita submetido à cultura axênica, não são associados ou dependentes de uma redução no número de promastigotas infecciosos em diferentes culturas ou passagens.

Outro importante aspecto foi a redução da infecciosidade observada *in vivo* (**Figura 5**) e *in vitro* (**Figura 7**) ao longo das passagens R0 e R30. Nos experimentos *in vitro* feitos com macrófagos murinos, além de uma diminuição significativa na porcentagem de macrófagos infectados, uma marcante redução do número de amastigotas intra-macrófagos foi observado. Além disso, quando os parasitas das passagens R0 e R30 foram usados para infectar camundongos BALB/c, foi observado que os animais infectados com parasitas de R0 desenvolveram a doença de maneira mais progressiva do que aqueles infectados com parasitas de R30, confirmando os resultados obtidos nos experimentos *in vitro*. Os dados obtidos nesse estudo estão em concordância com aqueles obtidos por Moreira e colaboradores (2012), que mostram que formas promastigotas de *L. infantum* apresentam uma diminuição significativa de virulência após 100 dias de cultura axênica.

## **5.2. Proteínas encontradas com diminuição de expressão ao longo do cultivo axênico**

Algumas das 37 proteínas encontradas com diminuição progressiva da intensidade dos *spots* ao longo do cultivo axênico (**Tabela 7**) são componentes de resistência a danos celulares, facilitadoras ou vitais para infecciosidade do parasita, e estão envolvidas com o controle da expressão de proteínas. Algumas proteínas estruturais também foram encontradas nessa situação.

É importante observar que entre os *spots* identificados tanto com aumento quanto com diminuição da intensidade, alguns apresentaram massas moleculares consideravelmente menores do que a massa da proteína predita. Esses podem representar apenas um fragmento dessa proteína, não representando a real variação celular da proteína, ou podem ser isoformas de menor massa molecular, que se diferem entre as espécies de *Leishmania* spp.. Tal fragmentação também pode ser indicativo da perda funcional da proteína íntegra.

### **5.2.1. Proteínas relacionadas à resistência a danos decorridos por compostos reativos de oxigênio ou outras fontes**

Algumas proteínas metabólicas identificadas nesse trabalho estão diretamente envolvidas com a manutenção do equilíbrio redox de diversos organismos. Assim sua

diminuição de expressão ao longo do cultivo axênico, pode contribuir para o controle da capacidade infectiva de *Leishmania* spp.. Exemplos dessas proteínas são citados abaixo.

A *Peroxidoxin* é uma proteína expressa no retículo endoplasmático de tripanosomatídeos, sob condições de alta demanda. Está envolvida com a resistência celular a compostos reativos de oxigênio (Demasi *et al.*, 2013), além de ser um fator de virulência identificado em *T.cruzi* (Piacenza *et al.*, 2012). Atua também como chaperona, evitando agregação da citrato sintase em *L. infantum* (Castro *et al.*, 2011). A *Peroxidoxin* foi uma das proteínas escolhidas para validação usando a técnica de *Immunoblotting* (**Seção 4.9**) que apresentou resultado corroborativo com o obtido pela 2-DE. A diminuição de sua concentração celular ao longo do cultivo axênico de *L. amazonensis* pode ser um importante evento relacionado com a diminuição de infecciosidade observada.

A *Malic enzyme* está envolvida com processos de desintoxicação celular por compostos reativos de oxigênio e reposição de NADPH para *T. brucei* (Allmann *et al.*, 2013), além de ser uma enzima essencial para a virulência de *Xantomonas campestris* (Tang *et al.*, 2005).

A proteína *Aldehyde dehydrogenase* atua na proteção contra danos decorrentes de estresse osmótico em mamíferos e plantas, além de estresse salino e ocasionado por desidratação em plantas (Brockner *et al.*, 2010).

### **5.2.2. Proteínas facilitadoras ou vitais para a infecciosidade do parasita**

A *Enolase*, que apresenta uma possível diminuição na expressão ao longo do cultivo *in vitro*, além de atuar na via glicolítica como uma das proteínas fundamentais, também pode estar presente na membrana do parasita, capturando plasminogênio e exercendo um papel fundamental para a interação do parasita com a célula do hospedeiro (Ghosh & Jacobs-Lorena, 2011).

A proteína HSP70 (*Heat Shock 70 kDa Protein*) também é importante para a manutenção da condição infectiva do parasita após mudanças no ambiente e para a proteostase (Shonhai *et al.*, 2011; Louw *et al.*, 2010). *L. infantum*, incapaz de expressar adequadamente HSP70, apresenta capacidade limitada de crescimento no interior de macrófagos (Folgueira *et al.*, 2008).

A Fosfatase 2C (*Phosphatase 2C*) atua em plantas como agente protetor contra morte celular (Park *et al.*, 2008) e também é um fator de virulência identificado em *Toxoplasma gondii* (Jan *et al.*, 2009) assim como o *Eukaryotic initiation factor 4A* - eIF4A (Gastens & Fischer, 2002), que também está relacionado com a resistência a

drogas anti-*Leishmania* (Singh *et al.*, 2008). A redução da expressão de todos esses elementos sabidamente relacionados com a virulência de alguns protozoários corrobora com os resultados observados neste trabalho.

A *Tryparedoxin peroxidase* é uma enzima expressa apenas em tripanosomatídeos, presente em alta concentração no estágio infeccioso do parasita, sendo modulada durante condições de estresse oxidativo em *T. cruzi* (Gadelha *et al.*, 2013). Também pode estar envolvida na resistência de *L. donovani* a drogas usadas para o combate ao parasita (Iyer *et al.*, 2008).

A proteína Rab1 (*Small GTP binding protein Rab1*) é de grande importância para o transporte vesicular secretório, incluindo o transporte de proteínas para membrana, além de processos de manutenção e organização do complexo de Golgi (Liu & Storrie, 2012). Em *T. brucei*, Rab1 está envolvida com o transporte de VSG (*Variance Surface Glicoprotein*) para a membrana, principal antígeno de superfície da forma sanguínea do parasita (Dhir *et al.*, 2004).

A proteína *UDP-Glucose Pyrophosphorylase* é um fator de virulência em *L. major*, sendo fundamental para a síntese de glicoconjugados da superfície celular (Steiner *et al.*, 2007).

A enzima *Metallo-peptidase, ClanMA(E), Family M32* é uma carboxipeptidase já identificada como fator de virulência em *T. cruzi* (Alvarez *et al.*, 2012), atuando no catabolismo de peptídeos, também favorecendo o crescimento e multiplicação do parasita (Isaza *et al.*, 2008). *Metallo-peptidase, Clan ME, Family M16* também pode estar envolvida com a virulência dos tripanosomatídeos (Jang *et al.*, 2012). Essa proteína está envolvida no controle do ciclo de vida de *T. brucei* (Mach *et al.*, 2013) e com o controle de remoção de ubiquitina (Ralat *et al.*, 2011). As peptidases da família m20/m25/m40 (*Peptidase m20/m25/m40 family like protein*) estão envolvidas com a disseminação, colonização e invasão de bactérias, por meio da clivagem de IL-1 $\beta$ , uma citocina de grande importância para ocorrência de processos inflamatórios (Kapur *et al.*, 1993).

### 5.2.3. Proteínas relacionadas ao controle da síntese protéica

Alguns fatores de iniciação ou outras proteínas descritas abaixo, que contribuem para a ocorrência adequada da tradução de proteínas tiveram uma redução da intensidade ao longo do cultivo axênico, sugerindo que a expressão de proteínas pode ser modulada negativamente em *Leishmania* spp. durante a diminuição de infecciosidade.

O *Eukaryotic translation initiation factor 3* está envolvido no controle básico da tradução, organizando a formação do complexo de preiniciação 43S (Querol-Audi *et al.*, 2013). O Fator de alongação 2 (*Elongation factor 2*), relacionado diretamente com a síntese *de novo* de proteínas, também pode estar envolvido com a patogenicidade devido a sua regulação por IL-1 $\beta$  (Jäger *et al.*, 2011).

A *60S acidic ribosomal protein P2-2* interage com fatores de transcrição aumentando a performance do ribossomo durante a tradução de algumas proteínas ou sua especificidade por certos mRNAs. Também pode estar envolvida com o reparo de DNA (Tchórzewski, 2002). A Endoribonuclease L-PSP (*Endoribonuclease L-PSP(pb5)*) está relacionada com a inibição da tradução (Morishita *et al.*, 1999).

O Fator de transcrição 3 (*Basic transcription factor 3*), um regulador básico da transcrição em eucariotos (Kusumawidjaja *et al.*, 2007), também está envolvido com a indução de apoptose em plantas (Huh *et al.*, 2012). O spot referente a essa proteína (Match ID 584) apresentou uma redução de mais de quatro vezes ao longo do cultivo axênico, indicando a importância da participação dessa proteína no controle da capacidade infectiva do parasita.

Não é possível somente pelos ensaios realizados determinar se a diminuição nos níveis dessas proteínas é a causa ou consequência da diminuição da transcrição de proteínas específicas observadas ao longo do cultivo do parasita.

#### 5.2.4. Proteínas estruturais

As proteínas do citoesqueleto também sofreram uma redução em sua expressão em *Leishmanias* cultivadas *in vitro* por longos períodos. As proteínas *Paraflagellar rod protein 1D* e *Paraflagellar rod protein 2C* estão envolvidas com a via ERK1/2 (Mattos *et al.*, 2012). A proteína do *Paraflagellar rod 1D* foi escolhida para validação usando a técnica de *Immunoblotting* e apresentou resultados corroborativos com a análise feita após 2-DE. Essa proteína estrutural se destacou pela sua importância na adesão de *T. cruzi* à célula do hospedeiro, mediante a presença de elementos da matriz extracelular (Mattos *et al.*, 2012), indicando que ela possa estar relacionada com a infecciosidade de tripanosomatídeos.

A Actina (*Actin*),  $\alpha$ -Tubulina ( $\alpha$ -*Tubulin*) e  $\beta$ -Tubulina ( $\beta$ -*Tubulin*) também foram encontradas com menor expressão ao longo do cultivo do parasita. A  $\alpha$ -Tubulina foi também escolhida para validação usando a técnica de *Immunoblotting* com resultado corroborativo ao obtido pela análise feita após 2-DE. Os resultados de *Immunoblotting*, em adição aos resultados obtidos após análise de 2-DE propõem a participação da

modulação do citoesqueleto durante a diminuição da infecciosidade dos parasitas cultivados *in vitro* por longos períodos.

### **5.3. Proteínas encontradas com aumento de expressão ao longo do cultivo axênico.**

As 19 proteínas que sofreram aumento progressivo da intensidade dos *spots* (**Tabela 8**) podem estar relacionadas a processos ligados a resistência ou ocorrência de estresse celular, a resposta e proteção do parasita contra fatores externos, a remediação da síntese protéica e recuperação de proteínas mal dobradas, ao restabelecimento das funções nucleares, além da maior parte das proteínas estar envolvida com metabolismo do parasita. Embora o estudo das proteínas com redução da expressão ao longo dos repiques pareça ser o mais relevante, o conhecimento das vias de sinalização em outros organismos que identificam cada vez mais elementos cujo aumento da expressão induz controle negativo e até mesmo bloqueio de vias relacionadas a infecciosidade, indica a necessidade de se avaliar minuciosamente também as proteínas cuja expressão aumenta ao longo do cultivo axênico de *Leishmanias*.

#### **5.3.1. Proteínas relacionadas à resistência a danos decorrentes de estresse celular**

Neste estudo foram encontradas algumas proteínas metabólicas cujo aumento dos níveis pode estar relacionado com a ocorrência de estresse oxidativo, possivelmente envolvido com a diminuição de infecciosidade ou virulência do parasita durante o cultivo axênico. A proteína *Mannose 1 phosphate guanyltransferase* está envolvida com a resposta ao estresse oxidativo em leveduras (Suslu *et al.*, 2011). O aumento da expressão da proteína *Isocitrate Dehydrogenase*, uma das principais enzimas responsáveis pela execução do ciclo do ácido cítrico, também envolvida com a resistência ao estresse oxidativo e nitrosilativo (Brown *et al.*, 2010), indica mudanças no balanço energético do parasita menos infeccioso. Além de ser a segunda enzima atuante na Via das pentoses fosfato, *6-phosphogluconolactonase* está envolvida com a resposta a danos oxidativos (Dill *et al.*, 2009) e síntese de hidroxialcanoatos em bactérias, fonte de energia e carbono (Poblete-Castro *et al.*, 2013). O aumento da expressão dessas proteínas sugere que vias metabólicas essenciais para o parasita estão sendo moduladas, indicando que alterações metabólicas podem estar diretamente ligadas ao controle da infecciosidade de *Leishmania*. É importante considerar ainda que a atuação de proteínas metabólicas em vias de sinalização

distintas têm sido identificadas em inúmeros organismos (Kornberg *et al.*, 2010; Jeffery, 2009; Sriram *et al.*, 2005). Assim, o aumento da expressão dessas proteínas também pode estar relacionada com sua atuação e controle em vias de sinalização relacionadas a capacidade infectiva do parasita.

A *Glucose regulated protein 78* apresenta sua expressão aumentada em condições induzidas de estresse celular, como bloqueio do ciclo celular, indução de proteínas mal dobradas, perturbação da homeostase de cálcio e análogos de aminoácidos (Kang & Welch, 1991). Essa proteína apresentou possível expressão aumentada ao longo dos repiques determinado por análise após 2-DE, sendo validada por técnica de *Immunoblotting*, com resultado corroborativo ao obtido inicialmente. O mesmo ocorreu para a Proteína de choque térmico 83 (*Heat Shock Protein 83; HSP-83*). A superexpressão de HSP83 em *L. donovani* está relacionada a condições de estresse por temperatura ou pH (Salotra *et al.*, 1994).

A *Vacuolar ATPase subunit-like protein* é uma proteína envolvida com a viabilidade e virulência de fungos por ser um regulador da homeostase do pH celular (Raines *et al.*, 2013) e está envolvida com a acidificação dos vacúolos digestivos em protozoários (Bakker-Grunwald, 1992). Essa proteína, quando presente na membrana plasmática de parasitas pode levar a uma acidificação do fagossomo, o que pode diminuir sua infectiosidade. Para evitar esse fato vários parasitas possuem mecanismos para inativar ou remover essas proteínas da membrana (Nordenfelt *et al.*, 2012). O aumento da expressão dessa proteína e sua provável localização membranar podem estar relacionados com a redução da capacidade infectiva de *Leishmanias* após longo tempo de cultivo, devido a uma acidificação do vacúolo parasitóforo ocasionando estresse celular.

### **5.3.2. Proteínas relacionadas à resposta e proteção do parasita contra fatores externos**

A proteína Usp (*Chain A Protein Structure Of Usp*) é indispensável para a síntese de carboidratos complexos, necessários para a proteção contra agentes capazes de causar danos externos ao parasita (Dickmanns *et al.*, 2011). A expressão dessa proteína pode estar aumentando por ativação de vias relacionadas a proteção do parasita a estresse, a danos causados por agentes externos específicos presentes no meio ou para compensação da baixa expressão de proteínas importantes para síntese de compostos protetores, como por exemplo da UDP-Glucose Pyrofosforilase relacionada a produção de glicoconjugados de superfície (**Seção 5.2.2.**). A proteína *Short chain dehydrogenase* está relacionada a resistência de bactérias a multidrogas



(Wang *et al.*, 2012). A proteína de transporte Sec13 (*Transport Protein Sec13*), além de estar relacionada com o transpote vesicular entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, está associada a Calcineurina, uma fosfatase chave para as respostas a sinais extracelulares em fungos (Kozubowski *et al.*, 2011). Sec13 também está envolvida com o processo de morte celular em tripanosomatídeos (Casanova *et al.*, 2008). O aumento nos níveis dessas proteínas indica uma grande correlação entre as alterações no ambiente externo e os eventos desencadeados no interior de parasita. Dessa forma, sugere-se que a sobrevivência de promastigotas por longos períodos em cultivo axênico podem desencadear eventos no parasita para sua adaptação a esse ambiente.

### **5.3.3. Proteínas relacionadas com a síntese protéica ou reenovelamento de proteínas mal dobradas**

O controle da síntese de alguns alvos protéicos pelo aumento da expressão de agentes reguladores e o controle de alguns elementos responsáveis pela manutenção da estrutura e função protéica podem estar sendo modulados. A Proteína 60S *acidic ribosomal subunit* é de vital importância para a síntese de proteínas. Já foi observado que sua inibição afeta diretamente a elongação das cadeias polipeptídicas (Keusch *et al.*, 1985). Sua expressão pode estar aumentando mediada por vias de sinalização como uma forma compensatória pela diminuição da expressão de outras proteínas envolvidas na síntese protéica. A proteína Hs1vu treonina peptidase (*Hs1vu complex proteolytic subunit-like*) está relacionada com o complexo hs1vu que é composto por duas proteínas de choque térmico (HSP-HsIU ATPase e HSP-HsIV peptidase). A peptidase atua na ativação do proteassomo 20S em *E. coli* (Yoo *et al.*, 1996). Essa peptidase pode estar sendo superexpressa devido a um acúmulo de proteínas mal-dobradas na célula. A proteína *Calreticulín* está envolvida com múltiplos processos celulares, como os relacionados ao enovelamento de proteínas, à homeostase de cálcio, à apoptose e à diferenciação celular. Essa proteína pode migrar do RE para a membrana em *T. cruzi* onde inativa o componente C1 do complemento, inibindo a atuação da via clássica e das lectinas (Ramírez *et al.*, 2012). Em *Leishmania*, Calreticulina está envolvida com a via secretória e atua como fator de virulência para o parasita (Debrabant *et al.*, 2002).

### **5.3.4. Proteínas relacionadas ao restabelecimento de funções nucleares**

A Proteína *Nucleosome assembly protein* é responsável pela manutenção e dinâmica da cromatina em eucariotos, carreando histonas até o núcleo, promovendo a fluidez da cromatina, além de atuar na transcrição de muitos genes (Park & Luger, 2006). A Proteína putativa 1 do complexo T (*Putative T-complex protein 1, theta subunit*) também pode estar envolvida com a compactação e remodelamento da cromatina. (Giuffrida *et al.*, 2006). Essas proteínas podem estar sendo superexpressas devido a uma possível disfunção nuclear, relacionada ao mecanismo de controle epigenético. A proteína Ciclina 1 (*Cyclin 1*) está envolvida na regulação do ciclo celular em *L. mexicana* (Ali *et al.*, 2010) e *L. donovani* (Banerjee *et al.*, 2003).

Os dados relatados acima sobre as proteínas encontradas, demonstram a complexidade das alterações no perfil proteômico que podem ocorrer durante o cultivo axênico de *L. amazonensis* promastigota relacionadas a diminuição da infecciosidade e virulência do parasita durante longo período de cultivo *in vitro*. Esses dados também apontam uma ampla variedade de eventos que devem ser melhor investigados, a fim de se identificar possíveis alvos terapêuticos, vacinais, além de elementos que podem ser usados para diagnóstico da doença.

#### **5.4. Metabolismo de *Leishmania* - Proteínas metabólicas que podem estar envolvidas com a diminuição da infecciosidade**

Atualmente, informações sobre o metabolismo de *Leishmania* spp. são limitadas. A maioria dos estudos sobre o parasita são relacionados com a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro contra a infecção. Grande parte do que se sabe é derivado de análises fenotípicas de mutantes de *Leishmania* spp. que são viáveis em cultura, mas que mostram reduzido crescimento e/ou sobrevivência em macrófagos ou em experimentos *in vivo* usando camundongos (McConville *et al.*, 2007). Como observado nas **figuras 11 e 13**, grande parte das proteínas identificadas neste trabalho estão envolvidas com o metabolismo e podem estar atuando de maneira fundamental para a diminuição da infecciosidade do parasita ao longo da cultura axênica de *L. amazonensis*.

*Leishmania* spp. são organismos auxotróficos, apresentando uma capacidade limitada de sintetizar uma ampla faixa de aminoácidos, purinas, vitaminas, lipídios e outros metabólitos necessários para o seu crescimento dentro do vacúolo parasitóforo (Williams *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 2008). Pesquisas feitas com parasitas mutantes mostram a necessidade de enzimas relacionadas a gliconeogênese (Naderer *et al.*, 2006) e a síntese de carboidratos específicos (Ilg, 2002; Garami & Ilg, 2001) para o crescimento do parasita dentro do vacúolo parasitóforo. Procedimentos experimentais

que afetam o catabolismo de arginina provocam um grave distúrbio no crescimento de amastigotas dentro desse vacúolo (Reguera *et al.*, 2009; Gaur *et al.*, 2007) indicando que o parasita precisa de mecanismos capazes de realizar o catabolismo de aminoácidos e possivelmente síntese *de novo* de poliaminas para seu desenvolvimento, além do reaproveitamento dos resíduos disponíveis no meio extracelular (McConville & Naderer, 2011).

*Leishmania* spp. e outros tripanosomatídeos possuem as enzimas das vias centrais de metabolismo atuantes em todos os estágios de desenvolvimento, sendo a glicose utilizada como fonte preferencial de carbono (Saunders *et al.*, 2010; Hart & Coombs, 1982). *L. mexicana* e *L. major*, incapazes de captar hexoses ou realizar o metabolismo de carboidratos sofrem grande atenuação do seu desenvolvimento em experimentos *in vivo* (Naderer *et al.*, 2010; Burchmore *et al.*, 2003). Processos essenciais são sustentados pelas hexoses captadas, como por exemplo, a Via das pentoses fosfato, a síntese de RNA/DNA, a N-glicosilação e a síntese de inositóis (Naderer *et al.*, 2008; Ilg, 2002). *L. major* geneticamente modificada, incapaz de sintetizar frutose-1,6-bifosfato em quantidade satisfatória, apresenta uma grande inibição de crescimento (Naderer *et al.*, 2006). *L. donovani*, após diferenciação para o estágio amastigota, expressa maior quantidade de enzimas envolvidas com a gliconeogênese (Rosenzweig *et al.*, 2008), evidenciando a importância da modulação desse processo para o parasita.

Aminoácidos podem ser fontes de carbono para o parasita, sendo que o genoma de *Leishmania* codifica um grande número de proteínas permeases de aminoácidos (Dumas *et al.*, 1997) e proteases que são reguladas positivamente durante a diferenciação para o estágio amastigota após a infecção (Besteiro *et al.*, 2007). Embora a captação de aminoácidos seja regulada de maneira positiva, estudos recentes mostram que poucos aminoácidos podem ser usados como fonte de carbono para o parasita, limitando-se basicamente a aspartato e alanina (Saunders *et al.*, 2011).

Assim, o metabolismo de carboidratos e aminoácidos é um evento importante para a captação de carbono e consequente desenvolvimento do parasita, havendo normalmente uma regulação positiva de enzimas envolvidas com glicólise/gliconeogênese, proteases e permeases de aminoácidos após a infecção. Neste trabalho foi observado uma diminuição de algumas enzimas relacionadas a esses processos (**Figura 14**), sendo que esse fato pode ter uma correlação direta com a diminuição de infecciosidade do parasita ao longo do cultivo axênico.

O catabolismo de ácidos graxos também é utilizado como fonte alternativa de carbono por patógenos intracelulares (Dumas *et al.*, 1997), no entanto a  $\beta$ -oxidação de ácido graxos em *Leishmania* possivelmente está relacionada a disponibilização de acetil-CoA para a respiração mitocondrial, já que esse parasita não apresenta enzimas do ciclo do glicoxalato necessárias para usar acetil-CoA como fonte de carbono, por intermédio da gliconeogênese (Naderer *et al.*, 2006). Enzimas envolvidas com a  $\beta$ -oxidação são reguladas positivamente em amastigotas de *L. donovani* e *L. major* (Paape *et al.*, 2008). Há uma diminuição de proteínas relacionadas a síntese de ácidos graxos apresentados na **Figura 14**, havendo normalmente seu aumento em parasitas promastigotas em etapa não divisória e em amastigotas axênicos (Blum, 1990; Hart & Coombs, 1982). Após a infecção, o parasita também pode obter ácidos graxos através das lipoproteínas de alta densidade ApoA-1 e Hpr. Essas lipoproteínas, quando clivadas, podem formar agentes capazes de lisar células promastigotas, mas não células amastigotas (Samanovic *et al.*, 2009). Assim, o menor desenvolvimento de lesões com parasitas da passagem R30, observada no ensaio *in vivo* (**Figura 5C**), pode estar relacionado com a incapacidade ou atraso na diferenciação desses parasitas para a forma amastigota, ocasionados por um mecanismo ainda desconhecido, havendo morte celular pela atuação de agentes líticos entregues junto as lipoproteínas de alta densidade.

A modulação do metabolismo do hospedeiro pela presença do parasita, também pode influenciar na disponibilidade de metabólitos e na proteção para a célula invasora. Espécies diferentes de *Leishmania* podem modular o metabolismo da célula hospedeira (Gaur *et al.*, 2007; Wanasen *et al.*, 2007). Por exemplo, a produção de citocinas relacionadas a uma resposta imune Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-12) gera uma regulação negativa de enzimas responsáveis pela disponibilidade de poliaminas e arginina para o parasita intracelular. Por outro lado, a produção de citocinas características de uma resposta Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13) induzem um aumento da disponibilidade de poliaminas (Das *et al.*, 2010). Estudos comprovam que o parasita intracelular também é capaz de modular as vias de sinalização da célula hospedeira (Bhardwaj *et al.*, 2010; Kima, 2007). A Gp63 e a protease CBP são duas proteínas expressas no parasita e endereçadas à célula hospedeira capazes de inativar a resposta dessa última a IFN- $\gamma$  (Contreras *et al.*, 2010; Matte & Descoteaux, 2010; Cameron *et al.*, 2004). A Gp63 pode inibir a tradução de proteínas, ativar vias relacionadas a resposta à escassez de aminoácidos na célula hospedeira e aumentar a renovação lisossomal, que pode contribuir para o crescimento do parasita (Jaramillo *et al.*, 2011). Assim, o parasita pode influenciar no metabolismo da célula hospedeira, gerando um

ambiente propício para a potencialização de sua virulência. Entre as proteínas encontradas neste trabalho pode haver agentes de atuação direta e indireta sobre essa modulação da célula hospedeira, principalmente as proteínas preditas capazes de interagir com vias de sinalização típicas do hospedeiro, como a Peroxidoxina, que deve ser melhor estudada.

#### 5.5. Predição e análise complementar – Análise de epítomos

Nesse trabalho foram preditos epítomos potencialmente capazes de desencadear uma resposta imunológica voltada a ativação de linfócitos T citotóxicos, a partir das 31 proteínas selecionadas (**Seção 4.8**). O objetivo dessa análise foi mostrar o potencial dos dados obtidos para a determinação de bons alvos vacinais. Futuramente, para um trabalho voltado a experimentação animal, como por exemplo um desafio de infecção usando peptídeos sintéticos ou expressos de maneira heteróloga, serão necessárias predições complementares. Já foi observado experimentalmente que regiões de uma proteína comuns a epítomos para células T CD4+ e T CD8+, podem ser interessantes para serem experimentados como alvos vacinais contra *Leishmania* spp. (Resende *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2006). A definição de bons adjuvantes e o teste de injeção desses com os peptídeos preditos, também é um passo importante para essa etapa de experimentação com animais em busca de bons agentes protetores.

Grandes lacunas ainda existem no conhecimento sobre mecanismos moleculares relacionados a infecciosidade de *Leishmania* spp. que impedem o combate efetivo e o desenvolvimento de agentes capazes de diminuir sua atuação mutilante e muitas vezes letal para o hospedeiro. Assim, este trabalho apresenta a complexidade dos mecanismos moleculares e aponta alguns alvos interessantes para futuros estudos em busca de novos agentes profiláticos e/ou terapêuticos voltados para o controle das leishmanioses.

## 6. RESUMO DOS RESULTADOS

- *Leishmania amazonensis* apresentou redução significativa de infecciosidade ao longo do cultivo axênico, ocorrendo uma estabilização entre 100 (R20) e 150 (R30) dias após o início das culturas;
- As análises feitas após a 2-DE mostraram-se adequadas para encontrar alvos interessantes que podem estar envolvidos com a diminuição da infecciosidade do parasita ao longo do cultivo axênico. Cinco proteínas foram validadas por *Immunoblotting*, apresentando variação compatível com aquelas observadas nas análises dos géis bidimensionais;
- Foram identificadas 56 proteínas de interesse para serem estudadas como alvos, sendo que 25 destas possuem estudos já realizados. Dessa forma, esse trabalho identificou 31 proteínas com potencial para serem estudadas em busca novos agentes vacinais contra as leishmanioses;
- Grande parte das proteínas identificadas com função conhecida correspondem a proteínas metabólicas, relacionadas à síntese, degradação e enovelamento de proteínas;
- Algumas proteínas foram encontradas podendo estar direta ou indiretamente envolvidas com a diminuição da infecciosidade do parasita, como a Peroxidoxina, GRP78, sendo algumas já conhecidas e outras potenciais alvos terapêuticos;

## 7. CONCLUSÃO

A cultura *in vitro* realizada com *L. amazonensis* recém-isolada da lesão de camundongos cronicamente infectados induziu a uma diminuição da infecciosidade dos parasitas. As proteínas diretamente relacionadas a esse processo, que aumentaram ou diminuíram sua expressão em termos significativos ao longo das mesmas, podem se apresentar como novos candidatos a serem avaliados como vacinas e/ou no tratamento imunoterapêutico da doença causada por essa espécie do parasita.

## 8. REFERÊNCIAS

- Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SMN, Cardoso FO, Souza CSF, *et al.* (2004) Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 121: 179–187.
- Achour YB, Chenik M, Louzir H, Dellagi K (2002) Identification of a disulfide isomerase protein of *Leishmania major* as a putative virulence factor. *Infect Immun* 70: 3576–3585.
- Aebischer T, Moody SF, Handman E (1993) Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous *Leishmaniasis*: a possible hazard for the host. *Infect Immun*; 61 : 220-6.
- Aguilar-Be I, da Silva Zardo R, Paraguai de Souza E, Borja-Cabrera GP, Rosado-Vallado M, *et al.* (2005) Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infection and immunity* 73: 812–819.
- Alaoui-Jamali MA and Xu YJ (2006) Proteomic technology for biomarker profiling in cancer: an update. *Journal of Zhejiang University Science B*, vol. 7, no. 6, pp. 411–420.
- Alcolea PJ, Alonso A, Larraga V (2011) Genome-wide gene expression profile induced by exposure to cadmium acetate in *Leishmania infantum* promastigotes. *Int Microbiol* 14: 1–11.
- Alcolea PJ, Alonso A, Sánchez-Gorostiaga A, Moreno-Paz M, Gómez MJ, *et al.* (2009) Genome-wide analysis reveals increased levels of transcripts related with infectivity in peanut lectin non-agglutinated promastigotes of *Leishmania infantum*. *Genomics* 93: 551–564.
- Alemeida SL, Dardo RH, Nogueira NGA, Costa RT, Rodrigues V, *et al.* (2011) Anti*Leishmania* immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral *Leishmaniasis*-endemic area in Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 84: 261–266.
- Ali NOM, Ibrahim ME, Grant KM, Mottram JC (2010) Molecular cloning, characterization and overexpression of a novel cyclin from *Leishmania mexicana*. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS* 13: 775–784.
- Allmann S, Morand P, Ebikeme C, Gales L, Biran M, *et al.* (2013) Cytosolic NADPH homeostasis in glucose-starved procyclic *Trypanosoma brucei* relies on malic enzyme and the pentose phosphate pathway fed by gluconeogenic flux. *The Journal of biological chemistry*.
- Almeida R, Norrish A, Levick M, Vetrie D, Freeman T, Vilo J, *et al.* (2002) From genomes to vaccines: *Leishmania* as a model. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 375 : 5-11.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, *et al.* (2012) *Leishmaniasis* Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7: e35671.
- Alvarez VE, Niemirowicz GT, Cazzulo JJ (2012) The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* 1824: 195–206.
- Anderson L, Seilhamer J (1997) A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, v.18, n.3-4, Mar-Apr, p.533-537.



- Armijos RX, Weigel MM, Aviles H, Maldonado R, Racines J (1998) Field trial of a vaccine against New World cutaneous *Leishmaniasis* in an at-risk child population: safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow-up. *J Infect Dis*; 177: 1352-7.
- Ashford RW (2000) The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *International journal for parasitology* 30: 1269–1281.
- Azizi H, Hassani K, Taslimi Y, Najafabadi HS, Papadopoulou B et al (2009) Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans *Leishmania tarentolae*. *Parasitology* 136:723–735.
- Bae SH, Harris AG, Hains PG (2003) Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. *Proteomics*, vol. 3, no. 5, pp. 569–579.
- Bakker-Grunwald T (1992) Ion transport in parasitic protozoa. *The Journal of experimental biology* 172: 311–322.
- Banerjee S, Banerjee R, Das R, Duttagupta S, Saha P (2003) Isolation, characterization and expression of a cyclin from *Leishmania donovani*. *FEMS microbiology letters* 226: 285–289.
- Banerjee S, Sen A, Das P, Saha P (2006) *Leishmania donovani* cyclin 1 (LdCyc1) forms a complex with cell cycle kinase subunit CRK3 (LdCRK3) and is possibly involved in S-phase-related activities. *FEMS Microbiol Lett* 256: 75–82.
- Barhoumi M, Tanner NK, Banroques J, Linder P, Guizani I (2006) *Leishmania infantum* LeIF protein is an ATP-dependent RNA helicase and an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast. *The FEBS journal* 273: 5086–5100.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Momen H, Mc Mahon-Pratt D, Jesus AR, et al. (1991). *Leishmaniasis* in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44: 536–546.
- Bates PA (1994) Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology* 8: 1–9.
- Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, Clos J, Bruchhaus I (2003) Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics*, v.3, n.9, Sep, p.1811-1829.
- Berberich C, Ramírez-Pineda JR, Hambrecht C, Alber G, Skeiky YA, et al. (2003) Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol* 170: 3171–3179.
- Berman J (2005) Miltefosine to treat *Leishmaniasis*. *Expert Opin Pharmacother*, v.6, n.8, Jul, p.1381-1388.
- Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* 37:1063–75.
- Bhardwaj S, Srivastava N, Sudan R, Saha B (2010) *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:109189.
- Bhaskar, Kumari N, Goyal N (2012) Cloning, characterization and sub-cellular localization of gamma subunit of T-complex protein-1 (chaperonin) from *Leishmania donovani*. *Biochem Biophys Res Commun* 429: 70–74.
- Blackstock WP, Weir MP (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in biotechnology*, v. 17, n. 3, p. 121-7.

- Blum JJ (1990) Effects of culture age and hexoses on fatty acid oxidation by *Leishmania major*. *J. Protozool.* 37:505–10.
- Borges MM, Campos-Neto A, Sleath P, Grabstein KH, Morrissey PJ, *et al.* (2001) Potent stimulation of the innate immune system by a *Leishmania brasiliensis* recombinant protein. *Infection and immunity* 69: 5270–5277.
- Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO (2002) Paraguai de Sousa E, Santos WR, Gomes EM. Long lasting protection against canine kala-azar using FML-Quil A saponin vaccine in an endemic area of Brazil. *Vaccine*; 20: 3277-84.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Bringaud F, Peris M, Zen KH, Simpson L (1995) Characterization of two nuclear-encoded protein components of mitochondrial ribonucleoprotein complexes from *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* 71: 65–79.
- Brockner C, Lassen N, Estey T, Pappa A, Cantore M, *et al.* (2010) Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *J Biol Chem* 285: 18452–18463.
- Brotherton MC, *et al.* (2010) Analysis of stage-specific expression of basic proteins in *Leishmania infantum*. *Journal of proteome research*, v. 9, n. 8, p. 3842-53.
- Brown SM, Upadhyaya R, Shoemaker JD, Lodge JK (2010) Isocitrate dehydrogenase is important for nitrosative stress resistance in *Cryptococcus neoformans*, but oxidative stress resistance is not dependent on glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Eukaryot Cell* 9: 971–980.
- Buda P, Reinbothe T, Nagaraj V, Mahdi T, Luan C, *et al.* (2013) Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit e controls intracellular calcium homeostasis by regulation of cav1.2 surface expression. *PLoS One* 8: e64462.
- Burchmore RJ, Rodriguez-Contreras D, McBride K, Merkel P, Barrett MP, *et al.* (2003) Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:3901–6.
- Burns JMJr, Parsons M, Rosman DE, Reed SG (1993) Molecular cloning and characterization of a 42 kDa protein phosphatase of *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem* 268: 17155–17161.
- Cahill DJ, Nordhoff E, O'Brien J, Klose J, Eickhoff H, Lehrach H (2001) Bridging genomics and proteomics. In: Pennington SR, Dunn MJ (Ed.). *Proteomics from protein sequence to function*. BIOS Scientific Publishers Limited.
- Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH, *et al.* (2004) Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J. Immunol.* 173:3297–304.
- Carrión J, Folgosa C, Soto M, Fresno M, Requena JM (2011) *Leishmania infantum* HSP70-II null mutant as candidate vaccine against *Leishmaniasis*: a preliminary evaluation. *Parasites & vectors* 4: 150
- Casanova M, Portalès P, Blaineau C, Crobu L, Bastien P, *et al.* (2008) Inhibition of active nuclear transport is an intrinsic trigger of programmed cell death in trypanosomatids. *Cell Death Differ* 15: 1910–1920.

- Castro H, Teixeira F, Romao S, Santos M, Cruz T, *et al.* (2011) *Leishmania* mitochondrial peroxiredoxin plays a crucial peroxidase-unrelated role during infection: insight into its novel chaperone activity. *PLoS pathogens* 7: e1002325.
- Celeste BJ, Angel SO, Castro LGM, Gidlund M, Goto H (2004) *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary *Leishmaniasis*. *Braz J Med Biol Res* 37: 1591–1593.
- CENEPI (2007) Manual for surveillance of American integumentary *Leishmaniasis*, 2nd ed. Brazilian Health Ministry, Brasília, Brazil. Disponível em: [http://www.crmv-mt.org.br/images/bt-arise/Artigos/manual\\_lta\\_2ed.pdf](http://www.crmv-mt.org.br/images/bt-arise/Artigos/manual_lta_2ed.pdf).
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, *et al.* (2007) Visceral *Leishmaniasis*: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature reviews Microbiology* 5: 873–882.
- Charest H, Zhang WW, Matlashewski G (1996) The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 271:17081–17090.
- Cheng J, Randall AZ, Sweredoski MJ, Baldi P (2005) SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Res.*;33:72076.
- Coelho EA, Tavares CA, Carvalho FA, Chaves KF, Teixeira KN, *et al.* (2003) Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun* 71: 3988–3994.
- Contreras I, Gomez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW, *et al.* (2010) *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog.* 6:e1001148.
- Convit J, Ulrich M, Zerpa O, Aranzazu N, Valera M, Villaroel H, *et al.* (2003) Immunotherapy of American cutaneous *Leishmaniasis* in Venezuela, 1990 to 1999. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 97: 1-4.
- Cordwell SJ, Nouwens AS, Walsh BJ (2001) Comparative proteomics of bacterial pathogens. *Proteomics*, v.1, n.4, Apr, p.461-472.
- Croft SL, Engel J (2006) Miltefosine--discovery of the anti*Leishmanial* activity of phospholipid derivatives. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.100 Suppl 1, Dec, p.S4-S8
- Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi JRG (2000) A Revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol. Today.*, 16(4):142-143.
- Da Silva R, Sacks DL (1987) Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun* 55: 2802–2806.
- Daifalla NS, Bayih AG, Gedamu L (2011) Immunogenicity of *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase B1 and peroxidoxin 4 in BALB/c mice: the contribution of toll-like receptor agonists as adjuvant. *Exp Parasitol* 129: 292–298.
- Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D (2010) Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog.* 6:e1000899.
- de Macedo-Silva ST, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JCF (2013) In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. *PloS one* 8: e83247.

- Dea-Ayuela MA, Rama-Iñiguez S, Bolás-Fernández F (2006) Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics* 6: 4187–4194.
- Debrabant A, Lee N, Pogue GP, Dwyer DM, Nakhasi HL (2002) Expression of calreticulin P-domain results in impairment of secretory pathway in *Leishmania donovani* and reduced parasite survival in macrophages. *International journal for parasitology* 32: 1423–1434.
- Demasi APD, Martinez EF, Napimoga MH, Freitas LL, Vassallo J, *et al.* (2013) Expression of peroxiredoxins I and IV in multiple myeloma: association with immunoglobulin accumulation. *Virchows Arch* 463: 47–55.
- Desjeux P (2001) The increase in risk factors for *Leishmaniasis* worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 239–243.
- Dhir V, Goulding D, Field MC (2004) TbRAB1 and TbRAB2 mediate trafficking through the early secretory pathway of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 137: 253–265.
- Dickmanns A, Damerow S, Neumann P, Schulz E-C, Lamerz A-C, *et al.* (2011) Structural basis for the broad substrate range of the UDP-sugar pyrophosphorylase from *Leishmania major*. *Journal of molecular biology* 405: 461–478.
- Dill BD, Dessus-Babus S, Raulston JE (2009) Identification of iron-responsive proteins expressed by *Chlamydia trachomatis* reticulate bodies during intracellular growth. *Microbiology (Reading, England)* 155: 210–219.
- Doyle PS, Engel JC, Pimenta PFP, Silva PP, Dwyer DM (1991) *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37°C. *Exp Parasitol* 73: 326–334.
- Drummelsmith J, Brochu V, Girard I, Messier N, Ouellette M (2003) Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics* 2: 146–155.
- Drummelsmith J, Girard I, Trudel N, Ouellette M (2004) Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *J Biol Chem* 279: 33273–33280.
- Duclert-Savatier N, Poggi L, Miclet E, Lopes P, Ouazzani J, *et al.* (2009) Insights into the enzymatic mechanism of 6-phosphogluconolactonase from *Trypanosoma brucei* using structural data and molecular dynamics simulation. *J Mol Biol* 388: 1009–1021.
- Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, *et al.* (1997) Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J.* 16:2590–98.
- Eggleston KK, Duffin KL, Goldberg DE (1999) Identification and characterization of falcylisin, a metallopeptidase involved in hemoglobin catabolism within the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 274: 32411–32417.
- El Fakhry Y, Ouellette M, Papadopoulou BA (2002) proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, v.2, n.8, Aug, p.1007-1017.
- Engel J (2002) Miltefosine, the story of a successful partnership: disease endemic country - TDR - pharmaceutical industry (Zentaris). *TDR News*, v.68, p.5.

- Eric D (2007) DNA Vaccines against protozoan parasites: Advances and challenges. *J Biomed Biotechnol*; 10: 1155-66.
- Feng X, Feistel T, Buffalo C, Mc Cormack A, Kravand E, *et al.* (2011) Remodeling of protein and mRNA expression in *Leishmania mexicana* induced by deletion of glucose transporter genes. *Mol Biochem Parasitol* 175: 39–48.
- Fernandes AP, Coelho EA, Machado-Coelho GL, Grimaldi G Jr, Gazzinelli RT (2012) Making an anti-amastigote vaccine for visceral *Leishmaniasis*: rational, update and perspectives. *Curr Opin Microbiol* 15(4):476–485.
- Fernandes AP, Costa MM, Coelho EA, Michalick MS, de Freitas E, Melo MN, Tafuri W, Hermont V, Resende DM, Abrantes C *et al.* (2008) Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26:5888–5895.
- Ferreira S de A, Almeida GG, Silva S de O, Vogas GP, Fujiwara RT, *et al.* (2013) Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS neglected tropical diseases* 7: e2150.
- Folgueira C, Carrión J, Moreno J, Saugar JM, Cañavate C, *et al.* (2008) Effects of the disruption of the HSP70-II gene on the growth, morphology, and virulence of *Leishmania infantum* promastigotes. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 11: 81–89.
- Frasch AP, Carmona AK, Juliano L, Cazzulo JJ, Niemirowicz GT (2012) Characterization of the M32 metalloprotease of *Trypanosoma brucei*: differences and similarities with its orthologue in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* 184: 63–70.
- Gadelha FR, Gonçalves CC, Mattos EC, Alves MJM, Piñeyro MD, *et al.* (2013) Release of the cytosolic trypanothione peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated *Trypanosoma cruzi* tissue culture-derived trypomastigotes. *Experimental parasitology* 133: 287–293.
- Ganguly NK (2002) Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral *Leishmaniasis*. *TDR News*, n.68, p.2.
- Garami A, Ilg T (2001) Disruption of mannose activation in *Leishmania mexicana*: GDP-mannose pyrophosphorylase is required for virulence, but not for viability. *EMBO J.* 20:3657–66.
- Garcez LM, Goto H, Ramos PK, Brigido MC, Gomes PAF, *et al.* (2002) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-induced cutaneous *Leishmaniasis* in the primate *Cebus apella*: a model for vaccine trials. *Int J Parasitol* 32: 1755–1764.
- Gastens MH, Fischer H-G (2002) *Toxoplasma gondii* eukaryotic translation initiation factor 4A associated with tachyzoite virulence is down-regulated in the bradyzoite stage. *International journal for parasitology* 32: 1225–1234.
- Gaur U, Roberts SC, Dalvi RP, Corraliza I, Ullman B, *et al.* (2007) An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous *Leishmaniasis*. *J. Immunol.* 179:8446–53
- Genaro O, de Toledo VP, Da Costa CA, Hermeto MV, Afonso LC, Mayrink W (1996) Vaccine for prophylaxis and immunotherapy. Brazil. *Clin Dermatol*; 14: 503-12.

- Ghosh A, Zhang WW, Matlashewski G (2001) Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infection. *Vaccine* 20:59–66.
- Ghosh AK, Jacobs-Lorena M (2011) Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 85–90.
- Gidwani K, Rai M, Chakravarty J, Boelaert M, Sundar S (2009) Evaluation of leishmanin skin test in Indian visceral *Leishmaniasis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 80: 566–567.
- Gill G, Beeching N (2009) Visceral *Leishmaniasis*. *Tropical Medicine*, 6<sup>th</sup> Edition. pp. 74–79.
- Giuffrida V, Pezzino FM, Romano F, Litrico L, Garofalo MR, *et al.* (2006) Gene expression in mouse spermatogenesis during ontogenesis. *International journal of molecular medicine* 17: 523–528.
- Goad LJ, Holz GG, JR E, Beach DH (1984) Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. *Mol Biochem Parasitol*, v.10, n.2, Feb, p.161-170.
- Godovac-Zimmermann J and Brown LR (2001) Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 20, no. 1, pp. 1–57.
- González M, Andrews E, Folch H, Sáez D, Cabrera A, *et al.* (2009) Cloning, expression and immunogenicity of the translation initiation factor 3 homologue of *Brucella abortus*. *Immunobiology* 214: 113–120
- Gonzalo RM, Rodríguez JR, Rodríguez D, González-Aseguinolaza G, Larraga V, *et al.* (2001) Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 3: 701–711.
- Göpfert U, *et al.* (1999) Proteophosphoglycans of *Leishmania mexicana*. Molecular cloning and characterization of the *Leishmania mexicana* ppg2 gene encoding the proteophosphoglycans aPPG and pPPG2 that are secreted by amastigotes and promastigotes. *The Biochemical journal*, v. 344 Pt 3, p. 787-95, 15.
- Gorg A, Weiss W, and Dunn MJ (2004) Current twodimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, vol. 4, no. 12, pp. 3665–3685.
- Grimaldi JrG, Tesh RB (1993) *Leishmaniasis* of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6: 230–250.
- Grimm F, Brun R, Jenni L (1991) Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. *Parasitol Res* 77: 185–191.
- Grogl M, Martin RK, Oduola AM, Milhous WK, Kyle DE (1991) Characteristics of multidrug resistance in *Plasmodium* and *Leishmania*: detection of P-glycoprotein-like components. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 45: 98–111.
- Guina T, Wu M, Miller SI, Purvine SO, Yi EC, Eng J, Goodlett DR, Aebersold R, Ernst RKE, Lee KA (2003) Proteomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* grown under magnesium limitation. *J Am Soc Mass Spectrom*, v.14, n.7, Jul, p.742-751.
- Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, *et al.* (1997) Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med*; 186 : 1137-47.

- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, v.19, n.3, Mar, p.1720-1730.
- Handman E, *et al.* (1983) Isolation and characterization of infective and non-infective clones of *Leishmania tropica*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 7, n. 2, p. 111-26
- Handman E, Mitchell GF, Goding JW (1981) Identification and characterization of protein antigens of *Leishmania tropica* isolates. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), v. 126, n. 2, p. 508-12.
- Harith AE, Kolk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Muigai R, *et al.* (1986) A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80: 583–36.
- Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, *et al.* (2004) The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic acids research* 32: D258–61.
- Hart DT, Coombs GH. (1982) *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp. Parasitol.* 54:397–409.
- Haynes Pa, Yates Jr (2000) Proteome profiling-pitfalls and progress. *Yeast* (Chichester, England), v. 17, n. 2, p. 81-7.
- Hommel M, *et al.* (1995) Experimental models for *Leishmaniasis* and for testing anti-*Leishmanial* vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 89 Suppl 1, p. 55-73.
- Huh SU, Kim K-J, Paek K-H (2012) Capsicum annum basic transcription factor 3 (CaBtf3) regulates transcription of pathogenesis-related genes during hypersensitive response upon Tobacco mosaic virus infection. *Biochemical and biophysical research communications* 417: 910–917.
- Hummadi YM, Al-Bashir NM, Najim RA (2006) *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: II. Effect of an immunomodulator, S(2) complex on the enzymes of the parasites. *Exp Parasitol* 112: 85–91.
- Hunger-Glaser I, Brun R, Linder M, Seebeck T (1999) Inhibition of succinyl CoA synthetase histidine-phosphorylation in *Trypanosoma brucei* by an inhibitor of bacterial two-component systems. *Mol Biochem Parasitol* 100: 53–59.
- Hunger-Glaser I, Seebeck T (1997) Deletion of the genes for the paraflagellar rod protein PFR-A in *Trypanosoma brucei* is probably lethal. *Mol Biochem Parasitol* 90: 347–351.
- Hussain MA, Naveed SA, Sechi LA, Ranjan S, Alvi A, *et al.* (2008) Isocitrate dehydrogenase of *Helicobacter pylori* potentially induces humoral immune response in subjects with peptic ulcer disease and gastritis. *PloS one* 3: e1481.
- Iborra S, Carrión J, Anderson C, Alonso C, Sacks D, *et al.* (2005) Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous *Leishmaniasis* in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infection and immunity* 73: 5842–5852.
- Ilg T (2002) Generation of *myo*-inositol-auxotrophic *Leishmania mexicana* mutants by targeted replacement of the *myo*-inositol-1-phosphate synthase gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120:151–56.

- Isaza CE, Zhong X, Rosas LE, White JD, Chen RP-Y, *et al.* (2008) A proposed role for *Leishmania major* carboxypeptidase in peptide catabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 373: 25–29.
- Iyer J P, Kaprakkaden A, Choudhary ML, Shaha C (2008) Crucial role of cytosolic tryparedoxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Mol Microbiol* 68: 372–391.
- Jackson MP, Pinto J, da Costa CA, Genaro O, Marques MJ, Modabber F, *et al.* (2002) Immunochemotherapy for cutaneous *Leishmaniasis*: a controlled trial using killed *Leishmania amazonensis* vaccine plus antimonial. *Inter J Dermatol*; 41: 73-8.
- Jäger D, Werdan K, Müller-Werdan U (2011) Endogenous ADP-ribosylation of elongation factor-2 by interleukin-1 $\beta$ . *Molecular and cellular biochemistry* 348: 125–128.
- Jan G, Delorme V, Saksouk N, Abrivard M, Gonzalez V, *et al.* (2009) A *Toxoplasma* type 2C serine-threonine phosphatase is involved in parasite growth in the mammalian host cell. *Microbes Infect.* 11: 935–945.
- Jang H Bin, Kim YK, Del Castillo CS, Nho SW, Cha IS, *et al.* (2012) RNA-seq-based metatranscriptomic and microscopic investigation reveals novel metalloproteases of *Neobodo* sp. as potential virulence factors for soft tunic syndrome in *Halocynthia roretzi*. *PloS one* 7: e52379.
- Jaramillo M, Gomez MA, Larsson O, Shio MT, Topisirovic I, *et al.* (2011) *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell Host Microbe* 9: 331–341.
- Jayakumar A, Castilho TM, Park E, Goldsmith-Pestana K, Blackwell JM, *et al.* (2011) TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8+ T Cell responses providing protection against *Leishmania* (Viannia). *PLoS neglected tropical diseases* 5: e1204.
- Jeffery CJ (2009) Moonlighting proteins--an update. *Molecular bioSystems* 5: 345–350.
- Jensen AT, Curtis J, Montgomery J, Handman E, Theander TG (2001) Molecular and immunological characterisation of the glucose regulated protein 78 of *Leishmania donovani*. *Biochim Biophys Acta* 1549: 73–87.
- Jensen ATR, Ismail A, Gaafar A, El Hassan AM, Theander TG (2002) Humoral and cellular immune responses to glucose regulated protein 78 -- a novel *Leishmania donovani* antigen. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 7: 471–476.
- Jensen ON (2004) Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*, v.8, n.1, Feb, p.33-41.
- Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, Voss AE, Berman J (1999) Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral *Leishmaniasis*. *N Engl J Med*, v.341, n.24, Dec 9, p.1795-1800.
- Joshi M, Pogue GP, Duncan RC, Lee NS, Singh NK, *et al.* (1996) Isolation and characterization of *Leishmania donovani* calreticulin gene and its conservation of the RNA binding activity. *Mol Biochem Parasitol* 81: 53–64.
- Kamhawi S (2000) The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2: 1765–1773.
- Kane MM, Mosser DM (2000) *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Current Opinion in Hematology*, v. 7, n. 1, p. 26-31.



- Kanehisa M (2002) The KEGG database. *Novartis Foundation symposium* 247: 91–101; discussion 101–3, 119–28, 244–52.
- Kang HS, Welch WJ (1991) Characterization and purification of the 94-kDa glucose-regulated protein. *The Journal of biological chemistry* 266: 5643–5649.
- Kapur V, Topouzis S, Majesky MW, Li LL, Hamrick MR, *et al.* (1993) A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microbial pathogenesis* 15: 327–346.
- Kassi M, Kassi M, Afghan AK, Rehman R, Kasi PM (2008) Marring *Leishmaniasis*: the stigmatization and the impact of cutaneous *Leishmaniasis* in Pakistan and Afghanistan. *PLoS neglected tropical diseases* 2: e259.
- Kaur J, Kaur T, Kaur S (2011) Studies on the protective efficacy and immunogenicity of Hsp70 and Hsp83 based vaccine formulations in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice. *Acta tropica* 119: 50–56.
- Kaye P, Scott P (2011) *Leishmaniasis*: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 9:604–615
- Kemp M (1997) Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. *APMIS Supplementum* 68: 1–33.
- Keusch GT, Donohue-Rolfe A, Jacewicz M (1985) Shigella toxin and the pathogenesis of shigellosis. *Ciba Foundation symposium* 112: 193–214.
- Khamesipous A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F., (2006) *Leishmaniasis* vaccine candidates for development: A global overview. *Indian J Med Res* 123, pp 423-438.
- Khanra S, Datta S, Mondal D, Saha P, Bandopadhyay SK, *et al.* (2012) RFLPs of ITS, ITS1 and hsp70 amplicons and sequencing of ITS1 of recent clinical isolates of Kala-azar from India and Bangladesh confirms the association of *Leishmania tropica* with the disease. *Acta Trop* 124: 229–234.
- Kima PE (2007) The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int. J. Parasitol.* 37:1087–96.
- Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Human Genetics*, vol. 26, no. 3, pp. 231–243.
- Ko KY, Kim J-W, Her M, Kang S-I, Jung SC, *et al.* (2012) Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. *Veterinary microbiology* 156: 374–380.
- Kornberg MD, Sen N, Hara MR, Juluri KR, Nguyen JVK, *et al.* (2010) GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. *Nature cell biology* 12: 1094–1100.
- Kozubowski L, Thompson JW, Cardenas ME, Moseley MA, Heitman J (2011) Association of calcineurin with the COPI protein Sec28 and the COPII protein Sec13 revealed by quantitative proteomics. *PloS one* 6: e25280.
- Kushawaha PK, Gupta R, Sundar S, Sahasrabudde AA, Dube A (2011) Elongation factor-2, a Th1 stimulatory protein of *Leishmania donovani*, generates strong IFN- $\gamma$  and IL-12 response in cured *Leishmania*-infected patients/hamsters and protects hamsters against *Leishmania* challenge. *J Immunol* 187: 6417–6427.
- Kusumawidjaja G, Kayed H, Giese N, Bauer A, Erkan M, *et al.* (2007) Basic transcription factor 3 (BTF3) regulates transcription of tumor-associated genes in pancreatic cancer cells. *Cancer biology & therapy* 6: 367–376.

- Lackovic K, Parisot JP, Sleebs N, Baell JB, Debien L, *et al.* (2010) Inhibitors of *Leishmania* GDP-mannose pyrophosphorylase identified by high-throughput screening of small-molecule chemical library. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1712–1719.
- Lainson R, Shaw JJ (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, Vol. 1 (W. Peters and R. Killick-Kendrick, eds), pp. 1–120. London: Academic Press.
- Leblanc E, Papadopoulou B, Bernatchez C, Ouellette M (1998) Residues involved in co-factor and substrate binding of the short-chain dehydrogenase/reductase PTR1 producing methotrexate resistance in *Leishmania*. *Eur J Biochem* 251: 768–774.
- Liu MA, Wahren B, Hedestam GBK (2006) DNA vaccines: Recent developments and future possibilities. *Human Gene Therapy*; 17: 1051-61.
- Liu S, Storrie B (2012) Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 69: 4093–4106.
- Liu Y, Koh CMJ, Sun L, Ji L (2011) Tartronate semialdehyde reductase defines a novel rate-limiting step in assimilation and bioconversion of glycerol in *Ustilago maydis*. *PLoS One* 6: e16438.
- Lopez MF (1999) Proteome analysis. I. Gene products are where the biological action is. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, v. 722, n. 1-2, p. 191-202.
- Louw CA, Ludewig MH, Mayer J, Blatch GL (2010) The Hsp70 chaperones of the Trityps are characterized by unusual features and novel members. *Parasitology international* 59: 497–505.
- Mach J, Poliak P, Matusková A, Zársky V, Janata J, *et al.* (2013) An Advanced System of the Mitochondrial Processing Peptidase and Core Protein Family in *Trypanosoma brucei* and Multiple Origins of the Core I Subunit in Eukaryotes. *Genome biology and evolution* 5: 860–875.
- Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, Falcone FH, Gavrilescu C, Montgomery JL, Santori MI, Stern LS, Wang Z, Ullu EE, Tschudi C (2000) A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA*, v.6, n.2, Feb, p.163-169.
- Marques-da-Silva EA, Coelho EAF, Gomes DCO, Vilela MC, Masioli CZ, *et al.* (2005) Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitology research* 98: 67–74.
- Martín OA, Villegas ME, Aguilar CF (2009) Three-dimensional studies of pathogenic peptides from the c-terminal of *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins and their interaction with a monoclonal antibody structural model. *PMC Biophys* 2: 4.
- Martínez-Rodríguez S, García-Pino A, Heras-Vázquez FJ, Clemente-Jiménez JM, Rodríguez-Vico F, *et al.* (2012) Mutational and structural analysis of L-N-carbamoylase reveals new insights into a peptidase M20/M25/M40 family member. *J Bacteriol* 194: 5759–5768.
- Martins DRA, Jeronimo SMB, Donelson JE, Wilson ME (2006) *Leishmania chagasi* T-cell antigens identified through a double library screen. *Infect Immun* 74: 6940–6948.

- Matte C, Descoteaux A (2010) *Leishmania donovani* amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1 $\alpha$  nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1 $\alpha$  and importin- $\alpha$ . *Infect. Immun.* 78:3736–43.
- Mattos EC, Schumacher RI, Colli W, Alves MJM (2012) Adhesion of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to fibronectin or laminin modifies tubulin and paraflagellar rod protein phosphorylation. *PLoS One* 7: e46767.
- McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T (2007) Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends Parasitol.* 23:368–75.
- McConville MJ, Naderer T (2011) Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annual review of microbiology* 65: 543–561.
- Mcnicoll F, Drummel-Smith J, Muller M, Madore E, Boilard N, Ouellette ME, Papadopoulou B (2006) A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, v.6, n.12, Jun, p.3567-3581.
- Medeiros IM, Nascimento ELT, Hinrichsen SL (2005) Leishmanioses (visceral e tegumentar). In: Hinrichsen SL. Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p.398-409
- Melby PC, Anstead GM (2001) Immune responses to protozoa. In: Clinical immunology: principles and practices. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroder Jr HW, Editors, 2nd Edition. Mosby Intern Limited: Mosby; 29: 1-29.13.
- Méndez S, Gurunathan S, Kamhawi S, Belkaid Y, Moga MA, et al. (2001) The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *Leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 166: 5122–5128.
- Misra S, Bennett J, Friew YN, Abdulghani J, Irvin-Wilson CV, et al. (2005) A type II ribonuclease H from *Leishmania* mitochondria: an enzyme essential for the growth of the parasite. *Mol and Biochem Parasitol* 143: 135–145.
- Mitchell GF, Handman E, Spithill TW (1984) Vaccination against cutaneous *Leishmaniasis* in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *Leishmania major* and importance of route of injection. *Aust J Exp Biol Med Sci* 62: 145–153.
- Mizbani A, Taslimi Y, Zahedifard F, Taheri T, Rafati S (2011) Effect of A2 gene on infectivity of the nonpathogenic parasite *Leishmania tarentolae*. *Parasitol Res* 109:793–799.
- Modabber F, Campos-Netto A, Reed S (2004) Vaccines against *Leishmaniasis*. In: Levine M, Kaper JB, Rappuoli R, Liu MA, Good MF, editors. *New generation vaccine*. New York: Dekker; p. 903-15
- Moore LL, Santrich C, LeBowitz JH (1996) Stage-specific expression of the *Leishmania mexicana* paraflagellar rod protein PFR-2. *Mol Biochem Parasitol* 80: 125–135.
- Moreira D, Santarém N, Loureiro I, Tavares J, Silva AM, et al. (2012) Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1469.
- Morishita R, Kawagoshi A, Sawasaki T, Madin K, Ogasawara T, et al. (1999) Ribonuclease activity of rat liver perchloric acid-soluble protein, a potent inhibitor of protein synthesis. *The Journal of biological chemistry* 274: 20688–20692.

- Mureev S, Kushnir S, Kolesnikov AA, Breitling R, Alexandrov K (2007) Construction and analysis of *Leishmania tarentolae* transgenic strains free of selection markers. *Mol Biochem Parasitol* 155: 71–83.
- Mutiso JM, Macharia JC, Kiio MN, Ichagichu JM, Rikoi H, *et al.* (2013) Development of *Leishmania* vaccines: predicting the future from past and present experience. *Journal of biomedical research* 27: 85–102.
- Naderer T, Ellis MA, Sernee MF, De Souza DP, Curtis J, *et al.* (2006) Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:5502–7.
- Naderer T, Heng J, McConville MJ (2010) Evidence that intracellular stages of *Leishmania major* utilize amino sugars as a major carbon source. *PLoS Pathogens* 6:e1001245.
- Naderer T, Wee E, McConville MJ (2008) Role of hexosamine biosynthesis in *Leishmania* growth and virulence. *Mol. Microbiol.* 69:858–69.
- Nadim A, Javadian E (1988) Leishmanization in Iran. In: Walton B, Wijeyaretne PM, Modabber F, editors. *Research on strategies for the control of Leishmaniasis*. Ottawa: International Development Research Center; p. 336-69.
- Nadim A, Javadian E, Tahvildar-Bidruni G, Ghorbani M (1983) Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous *Leishmaniasis*. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*; 76 : 377-83.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255–262.
- Niemirowicz G, Parussini F, Agüero F, Cazzulo JJ (2007) Two metallo carboxypeptidases from the protozoan *Trypanosoma cruzi* belong to the M32 family, found so far only in prokaryotes. *Biochem J* 401: 399–410.
- Nordenfelt P, Grinstein S, Björck L, Tapper H (2012) V-ATPase-mediated phagosomal acidification is impaired by *Streptococcus pyogenes* through Mga-regulated surface proteins. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 14: 1319–1329.
- Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero JE, Smith DF (2004) Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol Biochem Parasitol*, v.136, n.1, Jul, p.51-62.
- Oliveira AH, Ruiz JC, Cruz AK, Greene LJ, Rosa JC, *et al.* (2006) Subproteomic analysis of soluble proteins of the microsomal fraction from two *Leishmania* species. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 1: 300–308.
- Olivier M, Gregory DJ, Forget G (2005) Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:293–305.
- Paape D, Barrios-Lerena ME, Le Bihan T, Mackay L, Aebischer T (2010) Gel free analysis of the proteome of intracellular *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 169: 108–114.
- Paape D, Lippuner C, Schmid M, Ackermann R, Barrios-Llerena ME, *et al.* (2008) Transgenic, fluorescent *Leishmania mexicana* allow direct analysis of the proteome of intracellular amastigotes. *Mol. Cell Proteomics* 7:1688–701.

- Palatnik-de-Sousa CB, Dutra HS, Borojevic R (1993) *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP63 is the major immunogen component of the fucose-mannose ligand (FML). *Acta Trop*; 53: 59-72.
- Park C-J, Peng Y, Chen X, Dardick C, Ruan D, *et al.* (2008) Rice XB15, a protein phosphatase 2C, negatively regulates cell death and XA21-mediated innate immunity. *PLoS biology* 6: e231.
- Park Y-J, Luger K (2006) The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 1248–1253.
- Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE (1994) Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 152: 163–175.
- Peris M, Frech GC, Simpson AM, Bringaud F, Byrne E, *et al.* (1994) Characterization of two classes of ribonucleoprotein complexes possibly involved in RNA editing from *Leishmania tarentolae* mitochondria. *EMBO J* 13: 1664–1672.
- Pescher P, Blisnick T, Bastin P, Späth GF (2011) Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. *Cellular microbiology* 13: 978–991.
- Pêssoa SB, Martins AV (1988) *Parasitologia médica*. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 872.
- Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Martínez A, Radi R (2012) *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas' disease. *Antioxid Redox Signal* 19: 723–734.
- Poblete-Castro I, Binger D, Rodrigues A, Becker J, Martins-dos-Santos VAP, *et al.* (2013) In-silico-driven metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for enhanced production of poly-hydroxyalkanoates. *Metab Eng* 15: 113–123.
- Postigo JAR (2010) *Leishmaniasis* in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. *Intern J Antimicrob Agents*; 36(S) : 62-5.
- Priest JW, Hajduk SL (1996) *In vitro* import of the rieske iron-sulfur protein by trypanosome mitochondria. *J Biol Chem* 271: 20060–20069.
- Priest JW, Kwon JP, Montgomery JM, Bern C, Moss DM, *et al.* (2010) Cloning and characterization of the acidic ribosomal protein P2 of *Cryptosporidium parvum*, a new 17-kilodalton antigen. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 17: 954–965.
- Puah SM, Puthuchery SD, Chua KH (2013) Potential immunogenic polypeptides of *Burkholderia pseudomallei* identified by shotgun expression library and evaluation of their efficacy for serodiagnosis of melioidosis. *International journal of medical sciences* 10: 539–547.
- Pulvertaft RJ, Hoyle GF (1960) Stages in the life-cycle of *Leishmania donovani*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 54(2): 191–6.
- Querol-Audi J, Sun C, Vogan JM, Smith MD, Gu Y, *et al.* (2013) Architecture of Human Translation Initiation Factor 3. *Structure* (London, England : 1993).
- Raines SM, Rane HS, Bernardo SM, Binder JL, Lee SA, *et al.* (2013) Deletion of vacuolar proton-translocating ATPase V(o)a isoforms clarifies the role of vacuolar pH as a determinant of virulence-associated traits in *Candida albicans*. *The Journal of biological chemistry* 288: 6190–6201.

- Ralat LA, Kalas V, Zheng Z, Goldman RD, Sosnick TR, *et al.* (2011) Ubiquitin is a novel substrate for human insulin-degrading enzyme. *Journal of molecular biology* 406: 454–466.
- Ramírez G, Valck C, Aguilar L, Kemmerling U, López-Muñoz R, *et al.* (2012) Roles of *Trypanosoma cruzi* calreticulin in parasite-host interactions and in tumor growth. *Mol Immunol* 52: 133–140.
- Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, *et al.* (2003) Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21: 2474–2484.
- Reed SG (1996) Diagnosis of leishmaniasis. *Clinics in dermatology* 14: 471–478.
- Reed SG, Campos-Neto A (2003) Vaccines for parasitic and bacterial diseases. *Current opinion in immunology* 15: 456–460.
- Reguera RM, Balana-Fouce R, Showalter M, Hickerson S, Beverley SM (2009) *Leishmania major* lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* 165:48–56.
- Reiner SL, Locksley MR (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Ann Rev Immunol*; 13: 151-77.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S (2007) Cutaneous *Leishmaniasis*. *Lancet Infect Dis*; 7: 581-96.
- Resende DM, Caetano BC, Dutra MS, Penido ML, Abrantes CF, Verly RM, Resende JM, Piló-Veloso D, Rezende SA, Bruna-Romero O *et al* (2008) Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8+ T cells. *Vaccine* 26:4585–4593.
- Roberts LJ, Handman E, Foote SJ (2000) Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *BMJ (Clinical research ed)* 321: 801–804.
- Rodriguez-Cortes A, Ojeda A, Lopez-Fuertez L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, *et al.* (2007) Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK, and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine*; 25: 7962-71.
- Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, Medina, FS (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical Biochemistry* 401: 318-320.
- Rosenzweig D, Smith D, Myler PJ, Olafson RW, Zilberstein D (2008) Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics* 8: 1843–1850.
- Sacks DL, Perkins PV (1984) Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223: 1417–1419.
- Salotra P, Ralhan R, Bhatnagar R (1994) Differential expression of stress proteins in virulent and attenuated promastigotes of *Leishmania donovani*. *Biochemistry and molecular biology international* 33: 691–697.
- Samanovic M, Molina-Portela MP, Chessler AD, Burleigh BA, Raper J (2009) Trypanosome lytic factor, an antimicrobial high-density lipoprotein, ameliorates *Leishmania* infection. *PLoS Pathog.* 5:e1000276.
- Sánchez-Cañete MP, Carvalho L, Pérez-Victoria FJ, Gamarro F, Castanys S (2009) Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders

- Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 1305–1313.
- Saravia NG, *et al.* (1984) Two-dimensional electrophoresis used to differentiate the causal agents of American tegumentary *Leishmaniasis*. *Clinical chemistry*, v. 30, n. 12 Pt 1, p. 2048-52.
- Saunders EC, Chambers JM, Ng W, Naderer T, NgM, *et al.* (2011) Isotopologue profiling of *Leishmania mexicana* promastigotes under glucose replete and starvation conditions. *J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print].
- Saunders EC, DE Souza DP, Naderer T, Sernee MF, Ralton JE, *et al.* (2010) Central carbon metabolism of *Leishmania* parasites. *Parasitology* 137:1303–13.
- Scher R, Garcia JB, Pascoalino B, Schenkman S, Cruz AK (2012) Characterization of anti-silencing factor 1 in *Leishmania major*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 377–386.
- Scott DA, Hickerson SM, Vickers TJ, Beverley SM (2008) The role of the mitochondrial glycine cleavage complex in the metabolism and virulence of the protozoan parasite *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 283:155–65.
- Scott P, Artis D, Uzonna J, Zaph C (2004) The development of effector and memory T cells in cutaneous *Leishmaniasis*: the implications for vaccine development. *Immunol Rev*, 201 : 318-38.
- Segovia M, Artero JM, Mellado E, Chance ML (1992) Effects of long-term *in vitro* cultivation on the virulence of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. *Ann Trop Med Parasitol* 86: 347–354.
- Shaw J (2007) The leishmaniases--survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 541–547.
- Shonhai A, Maier AG, Przyborski JM, Blatch GL (2011) Intracellular protozoan parasites of humans: the role of molecular chaperones in development and pathogenesis. *Protein and peptide letters* 18: 143–157.
- Silva AM, Tavares J, Silvestre R, Ouaiissi A, Coombs GH, *et al.* (2012) Characterization of *Leishmania infantum* thiol-dependent reductase 1 and evaluation of its potential to induce immune protection. *Parasite Immunol* 34: 345–350.
- Simo G, Herder S, Cuny G, Hoheisel J (2010) Identification of subspecies specific genes differentially expressed in procyclic forms of *Trypanosoma brucei* subspecies. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 10: 229–237.
- Singh G, Chavan HD, Dey CS (2008) Proteomic analysis of miltefosine-resistant *Leishmania* reveals the possible involvement of eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A). *International journal of antimicrobial agents* 31: 584–586.
- Singh S (2006) New developments in diagnosis of *Leishmaniasis*. *The Indian journal of medical research* 123: 311–330.
- Singh VK, Jayaswal RKE, Wilkinson BJ (2001) Cell wall-active antibiotic induced proteins of *Staphylococcus aureus* identified using a proteomic approach. *FEMS Microbiol Lett*, v.199, n.1, May 15, p.79-84.
- Sjolander A, Baldwin TM, Curtis JM, Bengtsson KL, Handman E (1998) Vaccination with recombinant parasite surface antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. *Vaccine*; 16 : 2077-84.

- Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C (1996) Specific serodiagnosis of human *Leishmaniasis* with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 387–391.
- Souza VL, Vera PST, Welby-Borges M, Silva TMC, Leite BR, Ferraro RB, Meyer-Fernandes JR, Barral A, Costa JML, Freitas LAR (2011) Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from diferente clinical forms of human *Leishmaniasis* in CBA mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v106(1):23-31.
- Sriram G, Martinez JA, McCabe ERB, Liao JC, Dipple KM (2005) Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play? *American journal of human genetics* 76: 911–924.
- Stager S, Smith DF, Kaye PM (2000) Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral *Leishmaniasis*. *J Immunol*; 165: 7064-71.
- Stanley AC, Engwerda CR (2007) Balancing immunity and pathology in visceral *Leishmaniasis*. *Immunol Cell Biol*; 85: 138-47.
- Steiner T, Lamerz AC, Hess P, Breithaupt C, Krapp S, *et al.* (2007) Open and closed structures of the UDP-glucose pyrophosphorylase from *Leishmania major*. *J Biol Chem* 282: 13003–13010.
- Stern JJ, Oca MJ, Rubin BY, Anderson SL, Murray HW (1988) Role of L3T4+ and Lyt-2+ cells in experimental visceral *Leishmaniasis*. *J Immunol*; 140: 3971-77.
- Stober CB, Lange UG, Roberts MTM, Gilmartin B, Francis R, *et al.* (2006) From genome to vaccines for *Leishmaniasis*: screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection. *Vaccine* 24: 2602–2616.
- Stockdale L, Newton R (2013) A review of preventative methods against human *Leishmaniasis* infection. *PLoS neglected tropical diseases* 7: e2278.
- Sukumaran B, Tewary P, Saxena S, Madhubala R (2003) Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*. *Vaccine* 21: 1292–1299.
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson AE, Berman J (2002) Oral miltefosine for Indian visceral *Leishmaniasis*. *N Engl J Med*, v.347, n.22, Nov 28, p.1739-1746.
- Sundar S, Mehta H, Suresh AV, Singh SP, Rai ME, Murray HW (2004) Amphotericin B treatment for Indian visceral *Leishmaniasis*: conventional versus lipid formulations. *Clin Infect Dis*, v.38, n.3, Feb 1, p.377-383.
- Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, Goyal AK, Mandal AK, Voss A, Hilgard PE, Murray HW (1998) Trial of oral miltefosine for visceral *Leishmaniasis*. *Lancet*, v.352, n.9143, Dec 5, p.1821-1823.
- Suslu KG, Palabiyik B, Temizkan G (2011) Genes involved in glucose repression and oxidative stress response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genet Mol Res*. 10: 4041–4047.
- Swenerton RK, Zhang S, Sajid M, Medzihradsky KF, Craik CS, *et al.* (2011) The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem* 286: 429–440.
- Tang D-J, He Y-Q, Feng J-X, He B-R, Jiang B-L, *et al.* (2005) *Xanthomonas campestris* possesses a single gluconeogenic pathway that is required for virulence. *J Bacteriol* 187: 6231–6237.

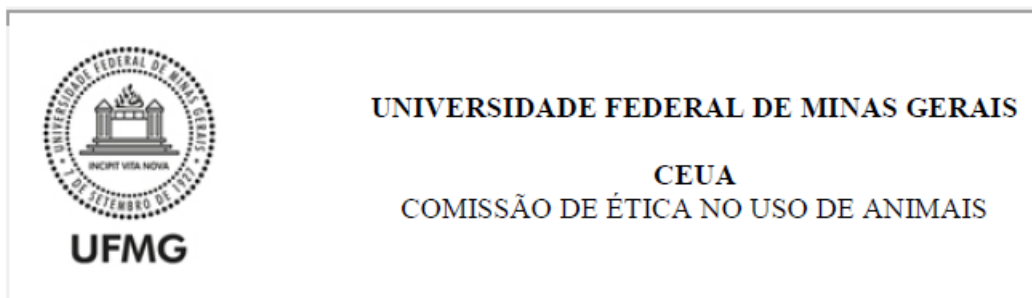


- Tavares CAP, Fernandes AP, Melo MN (2003) Molecular diagnosis of leishmaniasis. Expert review of molecular diagnostics 3: 657–667.
- Tchórzewski M (2002) The acidic ribosomal P proteins. The international journal of biochemistry & cell biology 34: 911–915.
- Tesh RB (1995) Control of zoonotic visceral *Leishmaniasis*: is it time to change strategies? Am J Trop Med Hyg 52(3):287–292
- Tielens AG, Van Grinsven KW, Henze K, Van Hellemond JJ, Martin W (2010) Acetate formation in the energy metabolism of parasitic helminths and protists. Int J Parasitol 40: 387–397.
- Trigo J, Abbehusen M, Netto EM, Nakatani M, Pedral-Sampaio G, de Jesus RS, *et al.* (2010) Treatment of canine visceral *Leishmaniasis* by the vaccine Leish-111f +MPL-SE. Vaccine; 28: 3333-40.
- Tull D, Naderer T, Spurck T, Mertens HD, Heng J, *et al.* (2010) Membrane protein SMP-1 is required for normal flagellum function in *Leishmania*. J Cell Sci 123: 544–554.
- Vercauteren FG, Arckens LE, Quirion R (2007) Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. Amino Acids, v.33, n.3, Sep, p.405-414.
- Walker J, Vasquez JJ, Gomez MA, Drummelsmith J, Burchmore R, *et al.* (2006) Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigote and axenic amastigotes. Mol Biochem Parasitol 147: 64–73.
- Wanasen N, MacLeod CL, Ellies LG, Soong L (2007) L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. Infect. Immun. 75:2802–10.
- Wang CC, Tsou CL (1993) Protein disulfide isomerase is both an enzyme and a chaperone. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 7: 1515–1517.
- Wang F, Wu K, Sun J, Wang Q, Chen Q, *et al.* (2012) Novel ISCR1-linked resistance genes found in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China. International journal of antimicrobial agents 40: 404–408.
- Weigle K, Saravia NG (1996) Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous *Leishmaniasis*. Clinics in dermatology, v. 14, n. 5, p. 433-50.
- Weiner HL (2001) Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev 182:207–214
- Werbovetz KA, Brendle JJ, Sackett DL (1999) Purification, characterization, and drug susceptibility of tubulin from *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol 98: 53–65.
- Williams RA, Westrop GD, Coombs GH (2009) Two pathways for cysteine biosynthesis in *Leishmania major*. Biochem. J. 420:451–62.
- World Health Organization (2010) Control of the *Leishmaniasis*: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of *Leishmaniases*, Geneva, 22-26 March 2010.
- World Health Organization (2014) Training in Tropical Disease (TDR) Leishmaniases. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> Acesso em: 2014 Feb 20.

- Wu H, Han Y, Qin Y, Cao C, Xia Y, *et al.* (2013) Whole-cell vaccine coated with recombinant calreticulin enhances activation of dendritic cells and induces tumour-specific immune responses. *Oncology reports* 29: 529–534.
- Xu D, Leiw FY (1994) Genetic vaccination against *Leishmaniasis*. *Vaccine* 1994; 12 : 1534-6.
- Yoo SJ, Seol JH, Kang MS, Chung CH (1996) Poly-L-lysine activates both peptide and ATP hydrolysis by the ATP-dependent HslVU protease in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 531–535.
- Zanin FHC, Coelho EAF, Tavares CAP, Marques-da-Silva EA, Silva Costa MM, *et al.* (2007) Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 9: 1070–1077.
- Zhang WW, Mendez S, Ghosh A, Myler P, Ivens A, Matlashewski G (2003) Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. *J Biol Chem* 278:35508–35515.

## 9. ANEXO

### 9.1. Aprovação do projeto na Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFMG



Senhor(a) Professor(a) EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE VIRULÊNCIA EM LEISHMANIA AMAZONENSIS POR IMUNOPROTEÔMICA COM APLICAÇÃO EM VACINAS PARA AS LEISHMANIOSES, submetido a esta comissão pelo protocolo 92 / 2012, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 25/04/2012.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 26/04/2012.

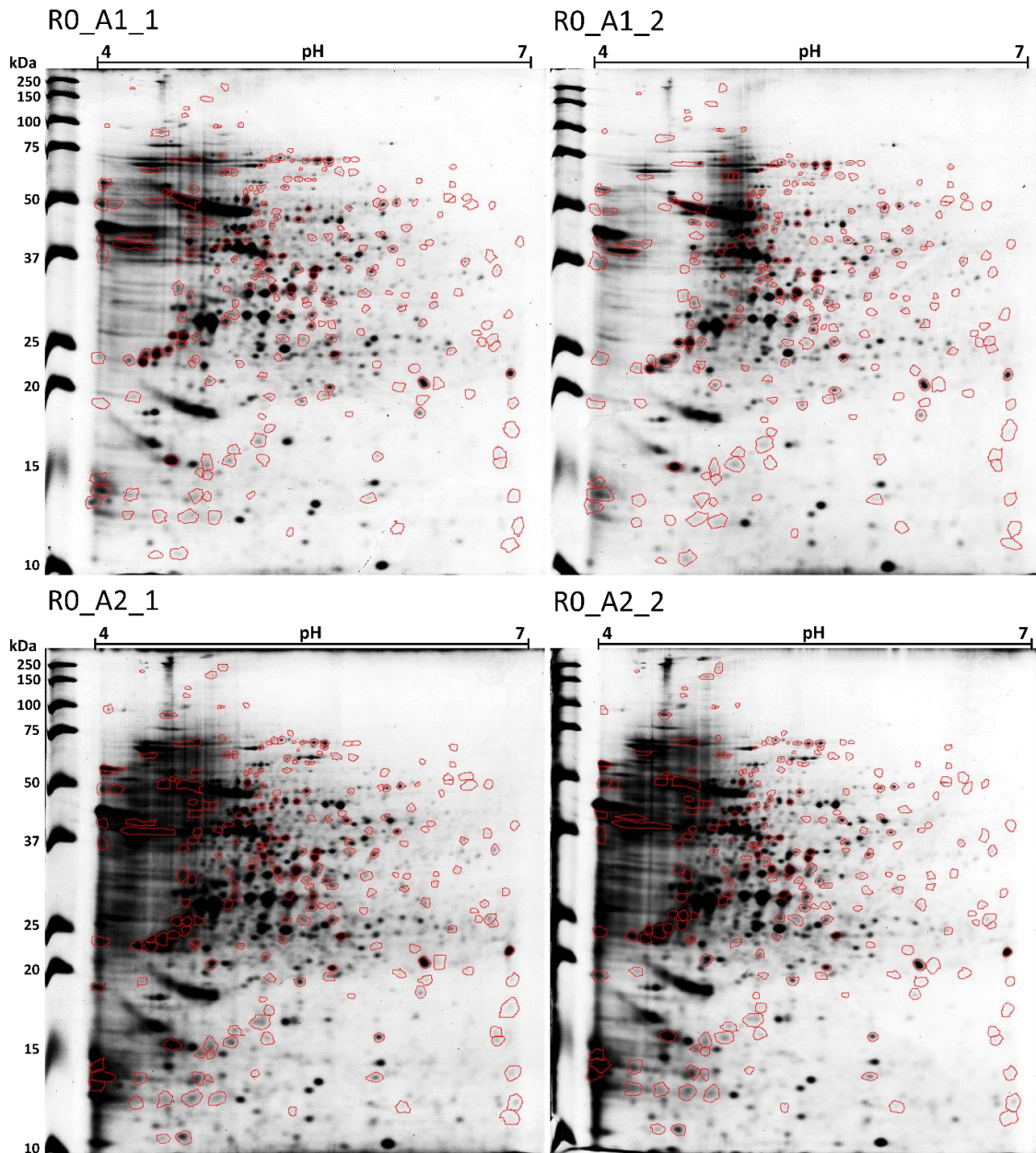
Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

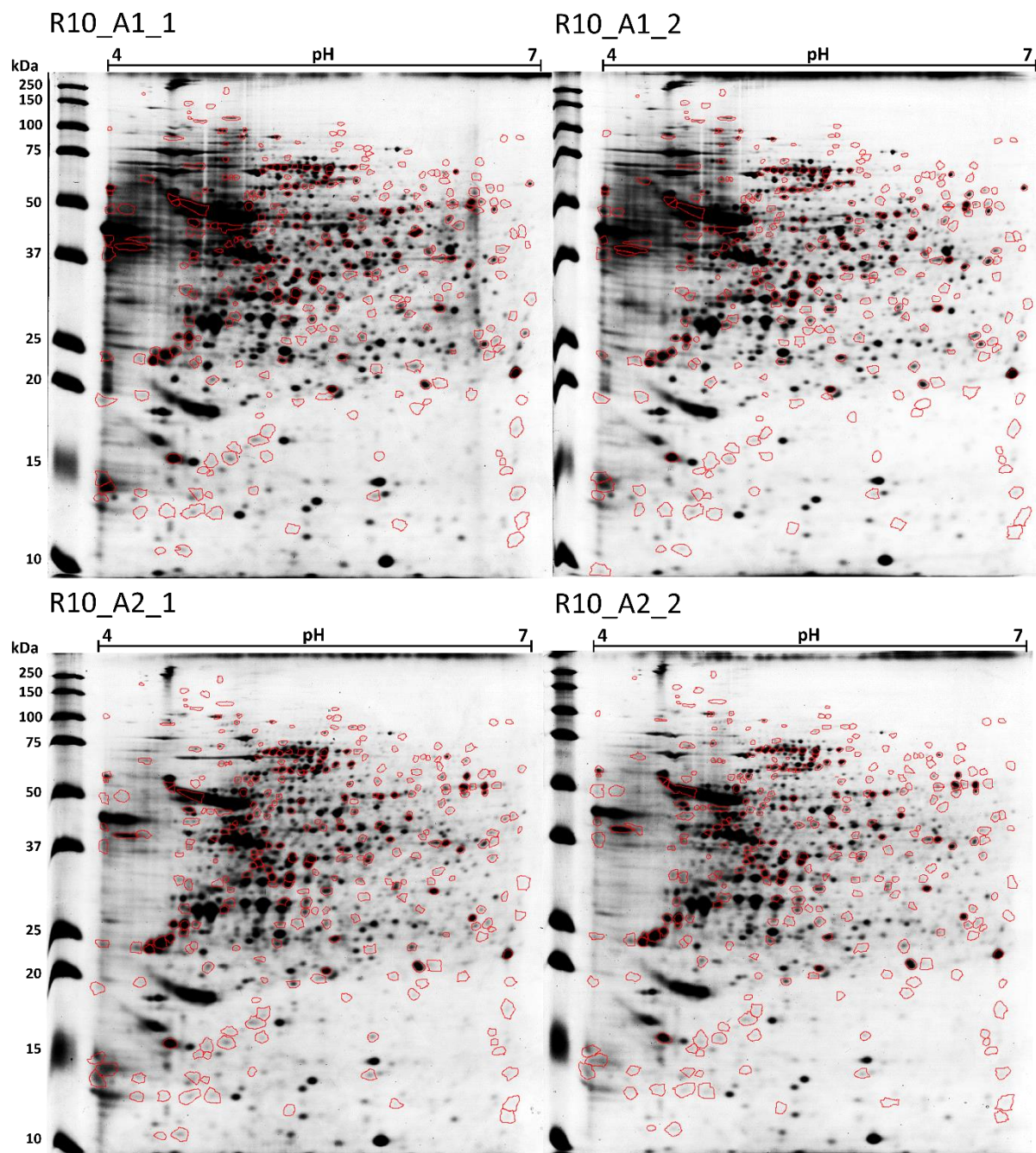
<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: [\(31\) 3499-4516](tel:(31)3499-4516) – Fax: [\(31\) 3499-4592](tel:(31)3499-4592)  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

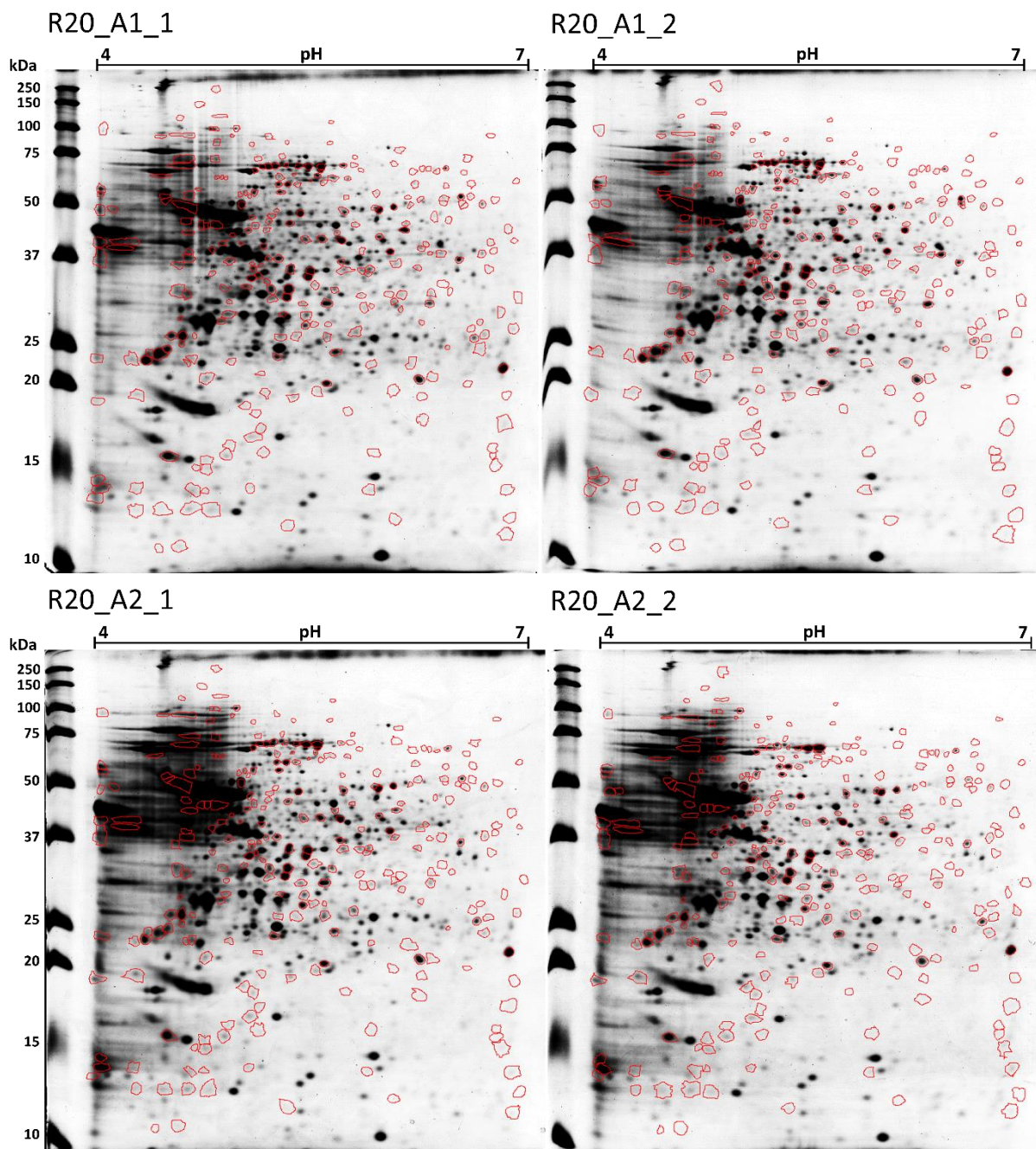
## 9.2. Figuras suplementares



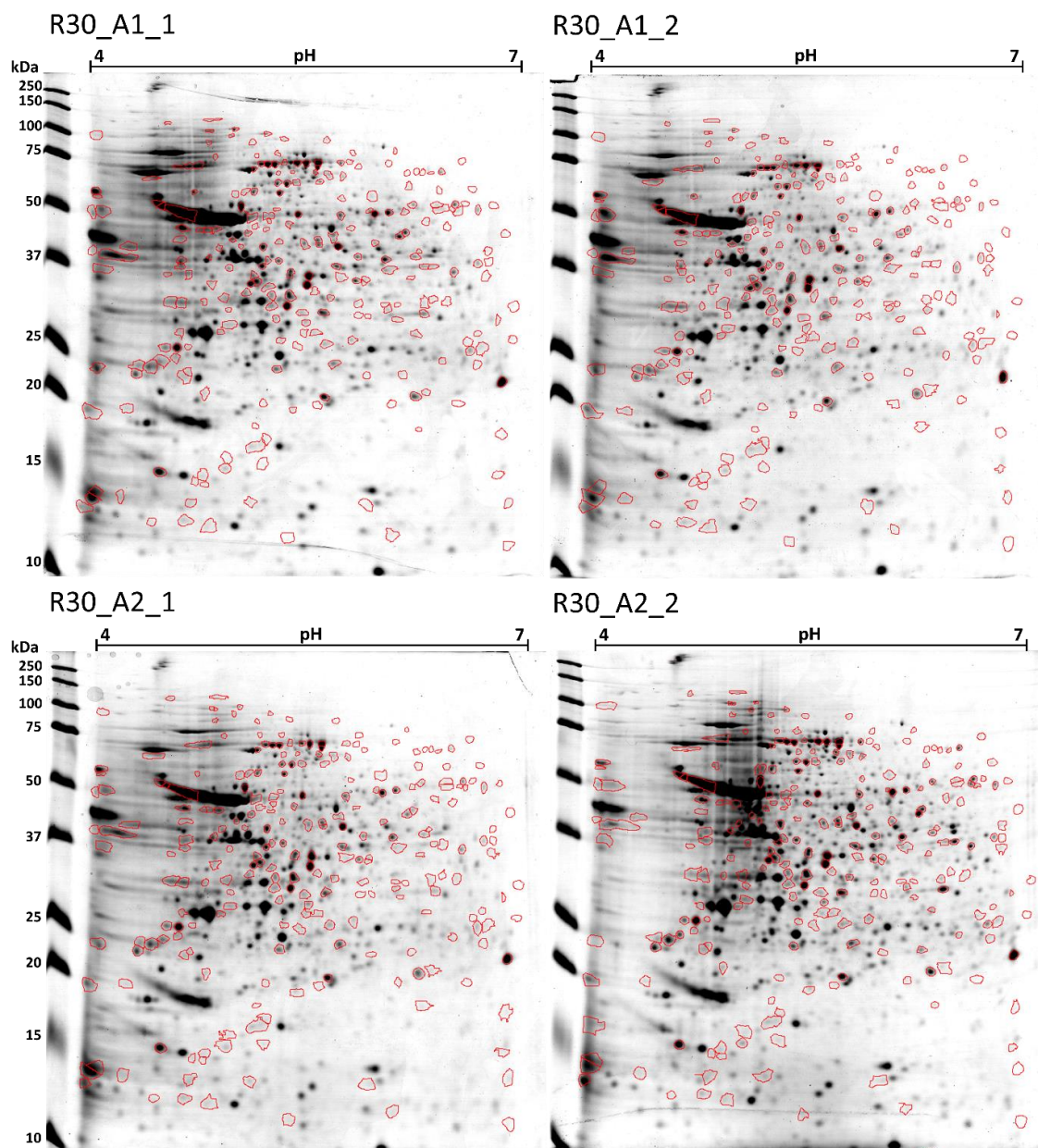
**Figura S1 – Géis bidimensionais de extratos totais de *L. amazonensis* obtidos de R0.** Representados acima estão os quatro géis bidimensionais obtidos após a separação dos extratos totais de parasitas nas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento da passagem R0. As amostras aplicadas em cada gel são provenientes de parasitas coletados da pata de dois animais (A1 e A2), cultivados de maneira independente em quatro garrafas de cultivo. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G250. Os *spots* contornados em vermelho correspondem aos 315 spots encontrados pelo programa, presentes em R0, com intensidade variando entre as passagens (ANOVA,  $p < 0,01$ ,  $fold > 2$ ).



**Figura S2 – Géis bidimensionais de extratos totais de *L. amazonensis* obtidos de R10.** Representados acima estão os quatro géis bidimensionais obtidos após a separação dos extratos totais de parasitas nas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento da passagem R10. As amostras aplicadas em cada gel são provenientes de parasitas coletados da pata de dois animais (A1 e A2), cultivados de maneira independente em quatro garrafas de cultivo. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G250. Os spots contornados em vermelho correspondem aos 315 spots encontrados pelo programa, presentes em R10, com intensidade variando entre as passagens (ANOVA,  $p < 0,01$ ,  $fold > 2$ ).



**Figura S3 – Géis bidimensionais de extratos totais de *L. amazonensis* obtidos de R20.** Representados acima estão os quatro géis bidimensionais obtidos após a separação dos extratos totais de parasitas nas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento da passagem R20. As amostras aplicadas em cada gel são provenientes de parasitas coletados da pata de dois animais (A1 e A2), cultivados de maneira independente em quatro garrafas de cultivo. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G250. Os *spots* contornados em vermelho correspondem aos 315 spots encontrados pelo programa, presentes em R20, com intensidade variando entre as passagens (ANOVA,  $p < 0,01$ ,  $fold > 2$ ).



**Figura S4 – Géis bidimensionais de extratos totais de *L. amazonensis* obtidos de R30.** Representados acima estão os quatro géis bidimensionais obtidos após a separação dos extratos totais de parasitas nas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento da passagem R30. As amostras aplicadas em cada gel são provenientes de parasitas coletados da pata de dois animais (A1 e A2), cultivados de maneira independente em quatro garrafas de cultivo. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G250. Os *spots* contornados em vermelho correspondem aos 315 spots encontrados pelo programa, presentes em R30, com intensidade variando entre as passagens (ANOVA,  $p < 0,01$ ,  $fold > 2$ ).

### 9.3. Tabela complementar

**Tabela S – Tabela com os dados obtidos após análise de 2-DE e MS sobre os 315 spots selecionados.** a) Número de identificação dos spots; b) Valor de tendência central de cada condição. A intensidade de cada spot foi normalizada em %Volume; c) Condições relativas a variação de intensidade de cada spot ao longo das passagens R0, R10, R20, R30, símbolos de > (maior) ou < (menor) correlacionam essa variação; d) *p-value* obtido após Análise de Variância (ANOVA) aplicada aos dados de variação de cada spot. Considerou-se  $p < 0,01$ ; e) O valor de *Fold* corresponde ao maior valor dividido pelo menor valor da tendência central(b) de um spot específico; f) Nome da proteína identificada por MS; g) Código de identificação do banco de dados UniProt; h) Pontuação dada pelo programa Mascot após análise dos dados obtidos na MS. Score =  $-10 \cdot \log(P)$ , onde P é a probabilidade da correlação entre o dado obtido experimentalmente e aquele presente no banco de dados ser ao acaso; i) Número total de peptídeos identificados componentes da proteína; j) Porcentagem da sequência da proteína que foi coberta pelos peptídeos identificados componentes da referida proteína; l) Ponto isoeletrico (pI) predito(pred) e esperado (esp); m) Massa molecular predita(pred) e esperada (esp), representada em kDa.

Match ID <sup>a</sup>	Intensidade dos spots (%V) <sup>b</sup>				Condições de Intensidade <sup>c</sup>	ANOVA <sup>d</sup>	Fold <sup>e</sup>	Identificação <sup>f</sup>	Uniprot ID <sup>g</sup>	Score <sup>h</sup>	Match Peptide <sup>i</sup>	Cobertura% <sup>j</sup>	pI(pred/esp) <sup>l</sup>	Mr(pred/esp) <sup>m</sup>
	R0	R10	R20	R30										
0	6,44E-02	8,24E-02	4,45E-02	4,05E-02	R0<10>20>30	2,56E-03	2,03	Conserved hypothetical protein	E9AVE2	35	2 (1)	5	5,15/6,43	17/47
1	4,87E-02	7,20E-02	6,10E-02	1,51E-01	R0<10>20<30	4,40E-04	3,11	Alpha tubulin	E9AP62	539	16(11)	28	5,08/5,45	46/61
7	1,86E-02	4,62E-02	2,99E-02	7,03E-02	R0<10>20<30	1,25E-03	3,77	Putative phosphomannose isomerase	E9B2T4	67	4(2)	7	5,65/5,38	42/47
8	5,36E-02	1,75E-01	2,36E-01	2,41E-01	R0<10<20<30	6,96E-03	4,49	Putative calreticulin	E9B259	74	3(3)	5	4,52/4,51	50/45
12	3,29E-02	5,62E-02	5,78E-02	8,28E-02	R0<10<20<30	2,41E-03	2,51	Putative isocitrate dehydrogenase	E9B494	292	16(6)	28	5,44/5,51	40/47
14	2,58E-02	4,64E-02	5,02E-02	7,78E-02	R0<10<20<30	1,80E-04	3,02	Succinyl-coa ligase [GDP-forming] beta-chain, putative	E9AT73	39	2(1)	6	6,03/6,77	35/45
16	3,99E-02	7,60E-02	6,28E-02	9,48E-02	R0<10>20<30	2,77E-04	2,38	Elongation factor 1-beta	E9B4Q3	115	5(3)	13	5,21/5,00	30/26
28	5,84E-02	1,38E-02	1,05E-02	2,05E-02	R0>10>20<30	4,51E-04	5,58	Putative protein phosphatase 2C	E9AQ14	72	1(1)	2	4,93/6,09	30/44
29	2,90E-02	5,43E-02	6,76E-02	4,23E-02	R0<10<20>30	5,96E-03	2,33	Não identificado						
32	2,95E-02	1,03E-02	1,36E-02	3,62E-02	R0>10<20<30	1,61E-05	3,50	Não identificado						
34	2,64E-01	1,21E-01	1,59E-01	3,79E-01	R0>10<20<30	7,34E-04	3,14	Chain A, Structural Analysis Of Leishmania Braziliensis Eukaryotic Initiation Factor 5a	A4HE05	47	2(1)	17	4,02/5,42	19/19
36	3,02E-01	1,04E-01	2,94E-01	1,33E-01	R0>10<20>30	2,11E-04	2,91	Heat shock 70 kda protein	P17804	96	5(3)	10	4,27/5,35	40/71
40	1,53E-02	2,89E-02	4,49E-02	4,34E-02	R0<10<20>30	3,76E-03	2,92	Heat shock protein 83; HSP 83	P27741	89	1(1)	1	6,27/5,00	31/81
45	1,46E-02	2,54E-02	1,32E-02	4,57E-02	R0<10>20<30	3,14E-03	3,47	Putative atpase beta subunit	E9AXJ6	233	7(4)	15	5,04/5,14	54/56
47	4,08E-02	5,87E-02	2,29E-02	5,07E-02	R0<10>20<30	2,93E-03	2,57	Putative pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	E9AXQ3	34	1(1)	3	5,18/5,42	32/38



51	1,13E-02	5,04E-02	3,01E-02	5,41E-02	R0<10>20<30	1,99E-03	4,77	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	E9AUA1	30	1(1)	2	5,39/5,37	57/61
55	9,09E-02	4,78E-02	4,79E-02	4,21E-02	R0>10<20>30	3,82E-05	2,16	Não identificado						
62	2,01E-02	4,80E-02	7,49E-02	4,87E-02	R0<10<20>30	6,53E-05	3,73	Putative 2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	E9B0E2	62	6(5)	25	5,77/5,40	26/31
66	2,65E-02	8,91E-03	1,95E-02	4,56E-02	R0>10<20<30	1,12E-03	5,11	Conserved hypothetical protein	E9AYH1	109	2(1)	6	4,82/4,95	34/36
69	3,53E-02	2,90E-02	1,76E-02	5,56E-02	R0>10>20<30	2,29E-05	3,17	Putative glutamine synthetase	E9AKR5	111	4(3)	12	5,81/5,71	38/43
72	1,54E-01	7,47E-02	8,46E-02	9,16E-02	R0>10<20<30	6,94E-03	2,06	Conserved hypothetical protein	E9B643	40	2(1)	1	4,68/6,69	13/75
74	1,92E-02	3,48E-02	2,51E-02	4,59E-02	R0<10>20<30	2,87E-05	2,39	Não identificado						
76	3,00E-02	2,42E-02	9,69E-03	1,72E-02	R0>10>20<30	2,85E-04	3,09	Malic enzyme	E9AWR7	343	13(8)	18	5,01/5,79	39/63
77	8,35E-02	4,25E-02	2,79E-02	5,68E-02	R0>10>20<30	1,22E-03	2,99	Putative phosphatase 2C	E9B0G2	362	8(7)	20	4,96/4,93	41/43
79	1,92E-02	3,06E-02	4,01E-02	6,76E-02	R0<10<20<30	1,88E-03	3,53	Alpha tubulin	E9AP62	36	1(1)	2	5,06/5,45	13/61
81	4,75E-02	3,28E-02	5,13E-02	2,43E-02	R0>10<20>30	8,36E-03	2,11	Isocitrate dehydrogenase, partial [Leishmania donovani]	I3VJQ6	135	7(4)	16	6,02/7,72	19/45
87	9,81E-02	3,00E-01	2,67E-01	2,97E-01	R0<10>20<30	1,54E-03	3,06	Elongation factor 1-beta	E9B4Q3	471	17(15)	47	5,32/5,00	30/26
88	8,43E-02	9,84E-02	2,09E-02	3,88E-02	R0<10>20<30	5,19E-04	4,70	Tubulin beta chain; Beta-tubulin	P21148	319	12(10)	26	4,61/4,72	27/51
107	9,24E-02	4,94E-02	4,45E-02	5,36E-02	R0>10>20<30	5,56E-03	2,07	Elongation factor 2	E9ASD6	53	1(1)	1	6,03/5,77	12/95
115	1,99E-01	1,39E-01	1,45E-01	9,65E-02	R0>10<20>30	4,84E-03	2,06	Alpha tubulin	E9AP62	31	1(1)	2	4,80/5,45	12/61
116	2,12E-01	1,65E-01	1,28E-01	9,72E-02	R0>10>20>30	7,24E-04	2,18	Conserved hypothetical protein	E9AVJ0	31	4(1)	1	4,65/5,63	12/55
125	1,13E-01	8,08E-02	5,07E-02	6,77E-02	R0>10>20<30	1,98E-03	2,22	Putative endoribonuclease L-PSP (pb5)	E9AW21	96	2(2)	9	5,86/5,52	13/17
126	1,34E-01	8,36E-02	9,15E-02	3,58E-02	R0>10<20>30	4,51E-03	3,75	Putative cyclophilin	E9B400	115	2(2)	8	6,79/9,17	13/29
139	1,35E-01	9,23E-02	5,62E-02	5,69E-02	R0>10>20<30	3,14E-03	2,40	Não identificado						
141	1,59E-01	1,06E-01	9,33E-02	7,64E-02	R0>10>20>30	6,91E-03	2,09	Conserved hypothetical protein	E9ANW9	142	2(2)	8	4,90/4,84	15/18
142	6,22E-01	4,66E-01	3,02E-01	2,87E-01	R0>10>20>30	7,97E-07	2,17	Putative small myristoylated protein-3	E9APT0	97	6(4)	32	4,51/4,70	15/13
144	8,24E-02	4,80E-02	4,02E-02	5,23E-02	R0>10>20<30	3,29E-03	2,05	Não identificado						
149	2,26E-01	1,24E-01	9,27E-02	1,45E-01	R0>10>20<30	2,12E-04	2,43	Ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor, putative	E9AQ29	25	4(0)	15	5,09/5,55	16/22
156	1,41E-01	1,02E-01	1,02E-01	2,87E-02	R0>10>20>30	2,65E-03	4,91	Paraflagellar rod protein 2C, partial	E9AQV5	38	1(1)	4	6,77/6,24	17/23
161	1,20E-01	4,55E-02	4,96E-02	3,09E-02	R0>10<20>30	4,38E-03	3,88	Alpha tubulin	E9AP62	95	3(2)	2	6,18/5,45	18/61

169	1,18E-01	7,30E-02	5,84E-02	3,72E-02	R0>10>20>30	4,95E-03	3,16	Putative small GTP-binding protein Rab1	E9AYX8	341	12(8)	60	5,36/5,54	19/22
172	6,38E-02	6,62E-02	1,17E-01	5,26E-02	R0<10<20>30	2,74E-03	2,23	Não identificado						
182	1,28E-01	2,81E-01	1,52E-01	2,06E-01	R0<10>20<30	3,11E-06	2,20	Peroxidoxin	E9AW04	504	21(19)	35	5,57/6,90	20/26
184	1,16E-01	8,96E-02	5,15E-02	4,82E-02	R0>10>20>30	3,24E-03	2,40	Peroxidoxin	E9AW04	91	2(2)	6	6,27/6,90	20/26
185	3,67E-01	2,75E-01	2,04E-01	1,75E-01	R0>10>20>30	3,08E-03	2,10	Chain a, the structure of tryparedoxin peroxidase i from leishmania major	Q4QF76	456	13(10)	21	6,19/6,79	20/25
188	1,47E-01	7,63E-02	1,04E-01	5,44E-02	R0>10<20>30	5,15E-03	2,71	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein; Antigen LACK	P62883	244	7(5)	13	4,78/6,05	20/35
191	3,09E-01	6,96E-01	4,60E-01	5,26E-01	R0<10>20<30	5,14E-05	2,25	Tryparedoxin peroxidase	E9AQA6	255	22(12)	35	6,77/6,31	21/23
198	6,64E-01	3,44E-01	2,45E-01	1,65E-01	R0>10>20>30	1,10E-03	4,03	Tubulin beta chain; Beta-tubulin	P21148	56	3(2)	6	4,35/4,72	22/51
200	4,50E-02	2,26E-02	4,71E-02	3,09E-02	R0>10<20>30	5,31E-03	2,08	Conserved hypothetical protein	E9APL2	28	1(1)	6	4,68/4,81	22/22
210	2,37E-01	1,44E-01	1,18E-01	1,40E-01	R0>10>20<30	1,10E-04	2,01	Conserved hypothetical protein	E9AXT3	358	13(9)	29	5,64/5,64	23/31
211	1,87E-01	9,57E-02	8,82E-02	1,09E-01	R0>10>20<30	1,56E-03	2,12	Conserved hypothetical protein	E9B549	161	5(5)	25	4,37/9,90	23/23
212	5,92E-01	4,60E-01	3,21E-01	2,46E-01	R0>10>20>30	7,88E-03	2,40	Tubulin beta chain; Beta-tubulin	P21148	694	18(16)	26	4,44/4,72	23/51
219	2,87E-01	1,90E-01	1,08E-01	9,52E-02	R0>10>20>30	1,34E-03	3,02	Tubulin beta chain; Beta-tubulin	P21148	335	14(9)	17	4,51/4,72	24/51
222	1,58E-01	6,84E-02	2,28E-02	5,18E-02	R0>10>20<30	6,71E-04	6,92	Tubulin beta chain; Beta-tubulin	P21148	318	9(8)	17	4,60/4,72	24/51
230	3,27E-02	7,05E-02	8,54E-02	7,53E-02	R0<10<20>30	8,48E-04	2,61	Putative short chain dehydrogenase	E9B602	45	3(1)	9	6,57/6,31	25/28
234	9,68E-02	4,39E-02	5,04E-02	3,66E-02	R0>10<20>30	4,63E-04	2,65	Não identificado						
235	8,97E-02	5,71E-02	4,17E-02	5,78E-02	R0>10>20<30	1,43E-04	2,15	Metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	E9B2A8	29	1(1)	1	6,64/5,06	25/120
239	6,85E-01	3,83E-01	2,60E-01	2,85E-01	R0>10>20<30	2,64E-05	2,64	Beta tubulin	E9AMJ8	665	20(15)	32	4,61/5,95	25/47
241	2,93E-01	1,59E-01	1,01E-01	9,42E-02	R0>10>20>30	8,65E-05	3,10	Beta tubulin	E9AMJ8	328	15(11)	15	4,54/5,95	25/47
245	1,05E-01	4,93E-02	8,54E-02	4,12E-02	R0>10<20>30	2,93E-03	2,55	Elongation factor 2	E9ASD6	27	1(1)	0	5,43/5,77	26/95
254	1,48E-01	9,96E-02	6,37E-02	4,24E-02	R0>10>20>30	3,45E-05	3,48	Tubulin beta chain; Beta-tubulin	P21148	321	11(9)	19	4,88/4,72	27/51
260	1,38E-01	1,10E-01	8,68E-02	5,20E-02	R0>10>20>30	4,90E-03	2,66	Succinyl-coa ligase [GDP-forming] beta-chain, putative	E9AT73	99	6(4)	12	5,44/6,77	28/45
262	1,12E-01	7,36E-02	5,54E-02	6,99E-02	R0>10>20<30	8,46E-03	2,03	Chain a, open and closed structures of the udp-glucose pyrophosphorylase from leishmania major	Q4QDU3	33	2(1)	2	4,92/5,84	28/56
274	2,13E-02	4,42E-02	4,90E-02	6,74E-02	R0<10<20>30	9,98E-06	3,16	Putative rieske iron-sulfur protein precursor	E9B632	47	2(1)	11	5,42/6,02	29/34
277	3,69E-02	2,10E-01	1,03E-01	1,09E-01	R0<10>20<30	8,66E-03	5,70	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein; Antigen LACK	P62883	891	19(19)	33	6,27/6,05	29/35

279	7,96E-02	1,46E-01	1,94E-01	1,50E-01	R0<10<20>30	6,34E-06	2,43	Putative rieske iron-sulfur protein precursor	E9B632	296	9(7)	43	5,57/6,02	29/34
291	5,31E-01	4,28E-01	3,07E-01	2,49E-01	R0>10>20>30	7,89E-06	2,13	Alpha tubulin	E9AP62	909	24(22)	31	5,33/5,45	31/61
292	2,39E-01	1,58E-01	1,10E-01	8,31E-02	R0>10>20>30	7,59E-05	2,88	Alpha tubulin	E9AP62	464	9(8)	20	5,21/5,45	31/61
295	1,52E-01	7,00E-02	1,48E-01	1,95E-01	R0>10<20<30	2,28E-03	2,79	Alpha tubulin	E9AP62	131	4(3)	6	4,57/5,45	31/61
296	9,66E-02	6,88E-02	4,13E-02	5,40E-02	R0>10>20<30	5,10E-04	2,34	Peptidase m20/m25/m40 family-like protein, partial	E9B1Y8	146	5(5)	15	5,04/5,10	32/38
303	3,93E-02	1,24E-01	1,85E-01	1,86E-01	R0<10<20<30	9,76E-05	4,75	Putative 60S acidic ribosomal subunit protein	E8NHJ8	496	26(21)	45	5,07/5,00	33/35
305	2,31E-01	3,84E-01	3,62E-01	4,83E-01	R0<10>20<30	3,68E-03	2,10	Elongation factor 2	E9ASD6	1568	44(39)	23	5,45/5,77	33/95
308	8,78E-02	7,98E-02	5,05E-02	1,50E-01	R0>10>20<30	3,36E-03	2,97	S-adenosylmethionine synthetase	E9B1C6	113	9(5)	16	5,12/5,42	34/44
312	6,40E-02	3,98E-02	2,74E-02	2,73E-02	R0>10>20>30	2,24E-05	2,35	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	E9AXJ1	22	2(1)	11	6,67/7,52	34/55
314	9,88E-02	2,42E-01	1,99E-01	1,71E-01	R0<10>20>30	6,20E-03	2,45	Conserved hypothetical protein	E9B1A6	125	8(3)	20	5,35/5,32	34/41
316	2,18E-01	4,48E-01	3,54E-01	3,97E-01	R0<10>20<30	6,54E-05	2,05	Beta tubulin	E9AMJ8	800	37(23)	49	5,47/5,95	34/47
319	2,86E-02	3,46E-02	3,97E-02	8,28E-02	R0<10<20<30	1,36E-05	2,90	Protein disulfide isomerase	E9AUD1	143	6(3)	17	5,09/5,04	35/53
324	5,97E-02	1,21E-01	8,29E-02	8,06E-02	R0<10>20>30	8,42E-04	2,03	Putative sterol 24-c-methyltransferase	E9AT15	439	15(12)	27	6,46/6,10	35/40
326	3,34E-02	6,93E-02	7,54E-02	1,08E-01	R0<10<20<30	1,72E-04	3,24	Mannose-1-phosphate guanyltransferase	E9AW11	304	10(7)	23	5,67/5,29	36/42
327	2,16E-02	3,79E-02	5,17E-02	2,99E-02	R0<10<20>30	3,74E-03	2,39	Vacuolar atpase subunit-like protein	E9AKM1	186	13(5)	25	4,93/4,85	36/42
331	4,38E-01	3,55E-01	5,96E-01	1,90E-01	R0>10<20>30	6,28E-03	3,14	Putative glucose regulated protein 94	E9AM02	45	2(1)	2	4,06/4,98	36/87
332	8,74E-02	6,60E-02	3,88E-02	4,74E-02	R0>10>20<30	9,04E-03	2,25	Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32	E9B493	120	4(2)	12	5,19/5,51	36/57
336	1,53E-01	1,24E-01	9,05E-02	6,67E-02	R0>10>20>30	3,67E-06	2,30	Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32	E9B493	338	19(8)	23	5,26/5,51	36/57
337	6,35E-02	3,52E-02	1,35E-01	6,99E-02	R0>10<20>30	5,99E-04	3,83	Protein phosphatase 2C; PP2C	P36982	38	1(1)	3	4,65/4,75	36/46
339	4,60E-02	9,58E-02	4,68E-02	5,24E-02	R0<10>20<30	1,89E-05	2,08	Putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase	E9AW40	108	3(2)	5	6,62/6,11	37/39
346	7,57E-02	4,33E-02	4,83E-02	1,23E-01	R0>10<20<30	3,81E-03	2,84	Conserved hypothetical protein	E9AWZ1	28	2(1)	0	4,65/8,05	37/354
348	8,17E-02	1,55E-01	1,76E-01	1,26E-01	R0<10<20>30	2,65E-03	2,16	Putative glutamine synthetase	E9AKR5	464	20(15)	30	6,00/5,71	37/43
354	2,29E+00	4,40E-01	5,06E-01	7,67E-01	R0>10<20<30	8,10E-03	5,22	Heat shock protein 83-1	E9B3L2	460	18(13)	19	4,21/5,04	38/81
355	6,67E-02	5,75E-02	7,16E-02	1,41E-01	R0>10<20<30	9,05E-04	2,45	Chain a, crystal structure of leishmania major s- adenosylhomocysteine hydrolase	Q4Q124	298	14(10)	27	5,16/5,72	39/48
365	9,11E-02	3,33E-01	3,29E-01	3,74E-01	R0<10>20<30	2,24E-04	4,11	Actin	P45520	842	33(23)	52	5,67/5,40	40/42

367	3,35E-02	9,05E-02	1,25E-01	7,05E-02	R0<10<20>30	1,37E-04	3,74	Elongation factor 2	E9ASD6	194	10(7)	9	5,55/5,77	40/95
379	5,62E-02	2,71E-01	1,29E-01	1,22E-01	R0<10>20>30	5,83E-03	4,82	Probable eukaryotic initiation factor 4A; eif-4A; ATP-dependent RNA helicase eif4a	O62591	895	25(23)	28	6,10/5,83	42/45
381	8,78E-02	7,91E-02	3,84E-02	5,35E-02	R0>10>20<30	1,05E-03	2,29	Protein disulfide isomerase	E9AUD1	139	12(7)	22	5,06/5,04	42/53
384	4,99E-02	3,95E-02	3,25E-02	2,38E-02	R0>10>20>30	6,01E-03	2,09	Paraflagellar rod protein 2C	E9AQV6	86	9(5)	7	5,11/5,73	44/77
388	1,10E-01	9,72E-02	6,83E-02	4,02E-02	R0>10>20>30	1,52E-04	2,73	Putative paraflagellar rod protein 1D	E9ALP7	261	12(7)	16	5,34/5,36	44/69
390	3,97E-02	2,45E-02	2,32E-02	1,68E-02	R0>10>20>30	6,98E-03	2,36	Putative paraflagellar rod protein 1D	E9ALP7	26	4(1)	4	5,20/5,36	45/69
392	7,58E-02	1,65E-01	1,89E-01	1,98E-01	R0<10<20<30	1,78E-04	2,61	Putative nucleosome assembly protein	E9ARZ6	406	17(9)	25	4,64/4,64	45/40
396	3,06E-02	2,50E-02	2,84E-02	7,67E-02	R0>10<20<30	2,42E-03	3,06	Conserved hypothetical protein	E9AUF6	48	2(2)	0	5,21/4,99	46/89
402	1,17E-01	2,56E-01	2,32E-01	2,39E-01	R0<10>20<30	8,16E-03	2,20	Putative paraflagellar rod protein 1D	E9ALP7	368	20(12)	30	5,40/5,36	47/69
405	3,32E-02	8,70E-02	7,81E-02	8,61E-02	R0<10>20<30	1,48E-03	2,62	Putative alanine aminotransferase	E9ANZ0	359	14(10)	22	5,70/5,49	47/56
408	2,71E-02	6,75E-02	4,50E-02	4,37E-02	R0<10>20>30	9,08E-04	2,49	Conserved hypothetical protein	E9AX57	83	3(1)	11	6,63/6,34	49/56
411	1,31E-01	7,88E-02	5,35E-02	3,04E-01	R0>10>20<30	4,92E-03	5,69	Não identificado						
412	3,57E-01	1,58E-01	1,34E-01	9,73E-02	R0>10>20>30	4,87E-03	3,68	Putative eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8	E9AUD5	74	4(3)	4	4,05/5,64	48/82
414	3,78E-02	6,03E-02	6,34E-02	3,10E-02	R0<10<20>30	3,54E-03	2,05	Putative vacuolar ATP synthase subunit b	E9B064	374	12(8)	18	5,90/5,72	48/56
415	9,66E-02	2,07E-01	1,56E-01	1,38E-01	R0<10>20>30	1,44E-03	2,14	Trypanothione reductase	E9AKE1	696	25(17)	34	6,02/5,58	48/54
417	1,45E+00	2,26E+00	2,29E+00	3,73E+00	R0<10<20<30	5,27E-03	2,57	Beta tubulin	E9AMJ8	1274	35(33)	55	4,65/5,95	48/47
420	3,03E-01	5,25E-01	5,73E-01	6,12E-01	R0<10<20<30	9,55E-04	2,02	Putative atpase beta subunit	E9AXJ6	2817	60(51)	49	5,02/5,14	49/56
424	4,25E-02	1,98E-01	8,22E-02	6,07E-02	R0<10>20>30	1,71E-06	4,67	Putative pyruvate kinase	E9B5P1	785	26(16)	37	6,48/6,91	51/55
429	3,50E-02	6,75E-02	5,59E-02	8,24E-02	R0<10>20<30	4,41E-05	2,36	Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	E9ASX8	461	12(8)	23	5,10/5,50	54/60
432	3,23E-02	4,98E-02	6,62E-02	1,08E-01	R0<10<20<30	3,65E-04	3,35	Putative T-complex protein 1, theta subunit	E9AUC7	590	27(18)	49	5,27/5,24	54/59
441	2,52E-02	6,82E-02	5,43E-02	4,65E-02	R0<10>20>30	2,48E-03	2,70	Chain a, transketolase from leishmania mexicana	Q8MPM3	125	8(6)	10	6,38/6,14	65/73
446	7,15E-02	2,79E-01	1,98E-01	2,22E-01	R0<10>20<30	9,93E-04	3,91	Putative glucose-regulated protein 78	E9AZT9	1271	46(32)	41	5,24/5,18	67/72
458	4,01E-03	7,30E-03	1,25E-02	1,30E-02	R0<10<20<30	2,57E-03	3,24	Chain a, protein structure of usp from I. Major in apo-form	D3G6S4	73	4(4)	3	5,36/5,34	63/69
460	4,32E-02	4,30E-02	2,04E-02	1,81E-02	R0>10>20>30	6,04E-04	2,39	Alpha tubulin	E9AP62	28	2(2)	2	6,07/5,45	28/61
463	4,85E-02	1,74E-02	4,45E-02	1,57E-02	R0>10<20>30	3,52E-03	3,09	Conserved hypothetical protein	E9B6X6	78	1(1)	5	4,77/7,80	14/22

464	1,71E-02	1,32E-01	2,41E-02	2,34E-02	R0<10>20>30	6,93E-04	7,70	Heat shock 70 kda protein	P14834	60	7(2)	8	6,54/6,45	26/57
468	5,81E-02	2,04E-01	1,78E-01	1,86E-01	R0<10>20<30	9,22E-04	3,52	Putative calreticulin	E9B259	53	5(1)	11	4,50/4,51	51/45
471	1,28E-02	4,52E-02	1,67E-02	2,35E-02	R0<10>20<30	1,15E-03	3,52	Putative carnitine/choline acetyltransferase	E9ALU2	46	2(2)	1	6,13/5,97	48/69
474	7,13E-02	2,51E-02	7,19E-02	2,15E-02	R0>10<20>30	7,64E-06	3,34	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	E9B170	125	5(3)	17	4,57/9,18	35/39
480	4,66E-02	1,08E-01	7,81E-02	3,86E-02	R0<10>20>30	1,24E-03	2,79	GTP-binding protein, putative	A4HEE8	176	10(7)	36	6,13/6,10	22/25
482	9,81E-03	4,61E-02	1,65E-02	7,85E-03	R0<10>20>30	2,70E-05	5,88	Chain a, open and closed structures of the udp-glucose pyrophosphorylase from leishmania major	Q4QDU3	32	1(1)	2	6,36/5,84	56/56
486	1,53E-02	2,46E-02	1,10E-02	4,81E-02	R0<10>20<30	2,04E-03	4,39	Putative atpase beta subunit	E9AXJ6	297	9(6)	20	5,00/5,14	53/56
496	9,61E-03	1,45E-02	6,32E-03		R0<10>20	1,26E-04	2,30	Chain a, crystal structure of ap endonuclease lmap from leishmania major	O15922	62	2(2)	3	5,06/8,90	52/51
497	5,56E-02	3,99E-02	1,13E-01	3,49E-02	R0>10<20>30	4,11E-03	3,25	Elongation factor 1-alpha	E9ARD0	306	8(6)	27	4,79/9,03	44/50
499	1,19E-02	2,61E-02	2,29E-02		R0<10>20	3,69E-07	2,18	Não identificado						
503	5,37E-02	2,42E-02	2,20E-02		R0>10>20	6,26E-04	2,44	Não identificado						
504	3,61E-02	1,69E-02	4,05E-02		R0>10<20	1,45E-04	2,40	Conserved hypothetical protein	E9AV52	39	2(2)	0	4,85/4,86	230/361
505	3,85E-01	1,87E-01	4,06E-01	1,33E-01	R0>10<20>30	8,21E-03	3,06	Heat shock protein 83; HSP 83	P27741	156	3(3)	5	4,05/5,00	40/81
510	9,96E-03	2,25E-02	2,27E-02	1,78E-02	R0<10<20>30	8,78E-03	2,28	Putative cyclin 1	E9AMR1	59	3(1)	13	5,99/5,67	31/36
514	2,94E-02	2,62E-02	3,23E-02	1,56E-02	R0>10<20>30	8,57E-03	2,08	Probable eukaryotic initiation factor 4A; eif-4A; ATP-dependent RNA helicase eif4a	O62591	78	1(1)	2	5,82/5,83	29/45
517	2,97E-02	2,39E-02	8,58E-03		R0>10>20	2,87E-04	3,47	Não identificado						
519	3,90E-02	1,65E-02	1,26E-02	1,14E-01	R0>10>20<30	2,13E-10	9,02	Putative eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	E9ATH0	205	7(5)	14	5,14/5,21	35/39
526	3,44E-02	1,96E-02	8,17E-02	8,98E-02	R0>10<20<30	2,10E-03	4,59	Kinetoplast-associated protein-like protein	E9AYS6	85	2(1)	1	4,08/4,24	95/146
529	2,31E-02	5,66E-02	6,94E-02	4,28E-02	R0<10<20>30	2,79E-03	3,00	Putative protein transport protein Sec13	E9B2C5	60	2(1)	9	5,69/5,51	34/37
534	5,30E-02	3,09E-02	1,92E-02	2,75E-02	R0>10>20<30	3,63E-03	2,76	Não identificado						
536	1,20E-01	8,97E-02	1,05E-01	2,10E-02	R0>10<20>30	3,56E-03	5,74	Não identificado						
546	4,81E-02	1,84E-02	1,43E-02		R0>10>20	4,31E-04	3,37	Putative proteasome alpha 1 subunit	E9AST1	63	2(2)	4	4,76/5,04	13/30
551	4,33E-02	2,10E-02	1,84E-02		R0>10>20	1,24E-06	2,35	Não identificado						
553	3,74E-02	1,62E-02	7,77E-03		R0>10>20	1,28E-06	4,82	Chain a, open and closed structures of the udp-glucose pyrophosphorylase from	Q4QDU3	33	1(1)	2	6,84/5,84	39/56

leishmania major														
555	6,95E-02	3,43E-02	2,44E-02		R0>10>20	8,91E-06	2,85	Não identificado						
558	6,03E-02	2,48E-02	1,84E-02		R0>10>20	1,85E-04	3,28	Não identificado						
575	2,13E-01	1,08E-01	7,08E-02		R0>10>20	1,10E-07	3,01	Alpha tubulin	E9AP62	61	1(1)	2	4,58/5,45	10/61
580	1,43E-01	1,14E-01	6,07E-02		R0>10>20	3,00E-04	2,36	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	E9B170	216	2(2)	9	6,83/9,18	12/39
582	1,31E-01	8,54E-02	8,93E-02	2,95E-02	R0>10<20>30	4,69E-03	4,44	Putative 40S ribosomal protein S15A	E9BAV6	30	2(1)	8	4,46/9,89	12/15
584	7,89E-01	2,89E-01	1,91E-01	3,62E-01	R0>10>20<30	6,69E-04	4,13	Putative basic transcription factor 3a	E9ATF9	31	1(1)	15	4,00/9,44	13/12
585	1,77E-01	7,26E-02	9,31E-02	9,54E-02	R0>10<20>30	2,27E-03	2,43	Tubulin beta chain; Beta-tubulin	P21148	50	1(1)	3	4,27/4,72	13/51
586	9,38E-01	3,28E-01	3,16E-01	8,04E-01	R0>10>20<30	2,51E-03	2,96	60S acidic ribosomal protein P2-2	Q06382	431	8(8)	52	4,04/4,23	13/11
589	8,48E-02	1,62E-02	2,73E-02		R0>10<20	2,45E-05	5,23	Chain a, the structure of trypanothione synthase from leishmania major	Q4QF76	98	3(2)	15	6,70/6,79	15/25
590	1,08E-01	4,51E-02	4,52E-02		R0>10<20	1,18E-05	2,40	Não identificado						
591	3,96E-02	1,25E-02	3,01E-02	2,01E-02	R0>10<20>30	7,18E-03	3,16	Conserved hypothetical protein	E9AYC3	27	1(1)	1	5,16/6,97	19/84
592	9,44E-02	7,26E-02	6,50E-02	2,77E-02	R0>10>20>30	4,58E-03	3,41	Peroxidoxin	E9AW04	87	4(3)	24	5,53/6,90	19/26
602	1,40E-01	9,43E-02	6,81E-02		R0>10>20	3,08E-04	2,05	Conserved hypothetical protein	E9B549	35	1(1)	4	4,27/9,90	22/23
603	4,87E-01	1,57E-01	1,95E-01	3,45E-01	R0>10<20>30	4,00E-03	3,10	GTP-binding protein, putative	A4HEE8	65	10(2)	26	4,05/6,10	23/25
606	5,67E-02	2,17E-02	1,22E-02	2,67E-02	R0>10>20<30	1,71E-05	4,63	Thiol-dependent reductase 1	E9B3K3	78	3(2)	12	6,38/5,65	24/46
611	8,48E-02	2,90E-02	1,22E-02	1,84E-02	R0>10>20<30	2,93E-04	6,94	Tubulin beta chain; Beta-tubulin	P21148	199	9(6)	11	4,69/4,72	25/51
615	3,78E-02	3,33E-02	2,38E-02	1,41E-02	R0>10>20>30	9,05E-03	2,68	Conserved hypothetical protein	E9ASM0	27	1(1)	0	6,61/7,09	27/147
616	7,17E-02	3,27E-02	1,33E-02	3,17E-02	R0>10>20<30	3,29E-05	5,39	Não identificado						
617	3,59E-02	2,15E-02	1,30E-02		R0>10>20	1,03E-05	2,75	Não identificado						
620	3,59E-02	2,96E-02	3,61E-02	6,85E-03	R0>10<20>30	2,52E-03	5,28	Conserved hypothetical protein	E9AW47	26	2(1)	1	6,75/8,59	28/36
621	2,19E-01	8,89E-02	4,60E-02		R0>10>20	1,99E-05	4,76	Putative proteasome alpha 3 subunit	E9APM4	592	18(16)	51	5,28/5,32	28/32
626	1,02E-01	5,65E-02	8,58E-02	1,55E-01	R0>10<20>30	1,72E-03	2,75	Elongation factor 1-alpha	E9ARD0	73	2(1)	7	4,64/9,03	31/50
633	1,02E-01	2,94E-02	4,69E-02	3,65E-02	R0>10<20>30	2,65E-07	3,47	Alpha tubulin	E9AP62	59	1(1)	2	5,49/5,45	32/61
640	7,99E-02	4,09E-02	3,21E-02	1,46E-02	R0>10>20>30	6,49E-03	5,49	Actin	P45520	40	4(2)	13	5,85/5,40	34/42

644	1,18E-01	4,54E-02	4,93E-02	4,64E-02	R0>10<20>30	1,65E-04	2,60	Calpain-like cysteine peptidase	E9AUQ7	41	2(1)	1	4,82/4,39	38/105
645	2,64E-02	1,42E-02	2,06E-02	1,08E-02	R0>10<20>30	8,71E-04	2,45	Putative cystathione gamma lyase	E9B6K2	54	4(2)	9	6,23/6,05	39/45
646	1,12E-01	8,79E-02	4,47E-02	4,13E-02	R0>10>20>30	1,56E-03	2,73	Heat shock 70 kda protein	Q07437	504	13(11)	14	4,88/6,05	39/45
651	5,68E-02	8,46E-02	5,47E-02	4,01E-02	R0<10>20>30	1,18E-04	2,11	Conserved hypothetical protein	E9AKR1	32	4(1)	0	5,92/6,44	40/130
653	1,07E-01	1,06E-01	9,07E-02	4,11E-02	R0>10>20>30	9,39E-03	2,60	Probable eukaryotic initiation factor 4A; eif-4A; ATP-dependent RNA helicase eif4a	O62591	116	8(4)	13	4,65/5,83	42/45
656	3,67E-02	2,42E-02	1,37E-02	1,36E-02	R0>10>20>30	1,57E-04	2,69	Paraflagellar rod protein 2C	E9AQV6	26	4(1)	5	5,18/5,73	43/77
658	4,76E-02	1,46E-02	1,02E-01	3,77E-02	R0>10<20>30	2,14E-03	6,97	Elongation factor 1-alpha, partial	E9ARD5	103	8(5)	24	4,74/8,03	44/46
667	3,40E-02	9,22E-02	6,08E-02	7,26E-02	R0<10>20<30	1,79E-04	2,71	Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	E9ASX7	612	17(13)	30	5,27/5,13	58/61
668	4,17E-02	1,11E-01	1,10E-01	1,11E-01	R0<10>20<30	3,70E-04	2,67	Heat shock protein 70-related protein	E9AYA3	124	5(4)	11	5,10/5,11	65/71
669	6,40E-02	2,38E-01	1,45E-01	3,19E-01	R0<10>20<30	1,76E-03	4,99	Putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor	E9B125	864	26(18)	25	5,54/5,67	65/71
670	1,26E-01	3,05E-01	3,94E-01	2,96E-01	R0<10<20>30	2,65E-06	3,13	Putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor	E9B121	1141	33(28)	31	5,46/5,68	67/73
671	5,02E-02	2,52E-01	1,81E-01	2,15E-01	R0<10>20<30	2,69E-03	5,02	Paraflagellar rod protein 2C	E9AQV6	730	38(21)	34	5,39/5,73	67/77
673	4,55E-02	4,08E-02	7,42E-02	2,06E-02	R0>10<20>30	2,39E-03	3,60	Paraflagellar rod protein 2C	E9AQV6	47	1(1)	2	4,86/5,73	71/77
676	1,54E-02	2,69E-02	5,77E-02	4,31E-02	R0<10<20>30	3,84E-03	3,75	Conserved hypothetical protein	E9ATK7	1122	33(22)	27	4,98/4,91	98/119
682	1,24E-02	2,82E-02	1,14E-02	4,77E-02	R0<10>20<30	1,93E-03	4,20	Conserved hypothetical protein	E9AVJ0	30	4(1)	1	6,36/5,63	49/55
683	1,02E-02	2,80E-03			R0>10	4,49E-07	3,65	Não identificado						
684	1,30E-02	3,06E-03	1,30E-02	1,73E-02	R0>10<20<30	3,43E-03	5,64	Não identificado						
685	5,82E-03	2,69E-03			R0>10	2,10E-05	2,17	Não identificado						
686	6,02E-01	3,91E-01	1,72E-01	4,48E-01	R0>10>20<30	5,89E-03	3,50	Putative basic transcription factor 3a	E9ATF9	188	6(4)	23	4,03/9,44	14/12
687	1,44E-02	3,32E-02			R0<10	7,62E-03	2,31	Conserved hypothetical protein	E9AV52	36	1(1)	0	5,44/4,86	57/361
688	4,96E-02	2,46E-02	2,98E-02		R0>10<20	9,97E-04	2,02	20s proteasome beta 7 subunit, (putative)	E9B5M9	31	1(1)	5	4,95/5,06	22/25
692	9,23E-02	2,36E-02	2,69E-02		R0>10<20	1,20E-05	3,92	Tryparedoxin peroxidase	E9AQA3	31	2(1)	5	6,69/6,31	16/23
696	5,15E-02	2,51E-02			R0>10	5,89E-05	2,05	Não identificado						
697	7,92E-02	4,72E-02	4,32E-02	3,24E-02	R0>10>20>30	1,47E-03	2,45	Conserved hypothetical protein	E9B489	90	1(1)	4	5,27/5,36	25/36
698	2,59E-02	5,94E-02	3,23E-02	3,26E-02	R0<10>20<30	1,91E-03	2,29	Pyruvate kinase [Leishmania infantum JPCM5]	A4IAQ1	179	10(7)	19	6,36/6,48	51/56

700	3,82E-02	9,83E-03	6,10E-03		R0>10>20	8,53E-03	6,27	Não identificado						
701	4,67E-02	9,33E-03	5,51E-03		R0>10>20	1,66E-04	8,48	Transitional endoplasmic reticulum atpase,putative	E9ASQ6	122	2(1)	4	4,88/5,19	61/88
702	3,34E-01	1,00E-01	4,28E-01	3,33E-01	R0>10<20>30	1,25E-03	4,28	Paraflagellar rod protein 2C	E9AQV6	107	9(5)	9	4,67/5,73	68/77
708	1,19E-01	4,63E-02	3,42E-02		R0>10>20	7,14E-07	3,48	Não identificado						
710	5,82E-02	3,38E-02	1,12E-01		R0>10<20	1,70E-04	3,30	Alpha tubulin	E9AP62	28	1(1)	2	4,67/5,45	53/61
711		1,60E-02	1,69E-02	3,62E-02	R10<20<30	6,04E-04	2,26	Putative protein kinase A regulatory subunit	E9AP50	768	27(19)	31	4,72/4,79	55/57
719		2,74E-02	2,66E-02	7,50E-02	R10>20<30	1,07E-05	2,81	Putative rab-GDP dissociation inhibitor	E9ALK7	216	9(7)	21	6,11/5,81	43/50
722	2,05E-02	4,86E-02	4,89E-02	2,46E-02	R0<10<20>30	1,14E-03	2,38	Não identificado						
728	4,67E-02	7,25E-02	2,10E-02	2,23E-02	R0<10>20<30	9,66E-03	3,46	Conserved hypothetical protein	E9B6B3	26	1(1)	0	6,50/4,69	48/101
729		8,09E-02	2,55E-02	2,08E-02	R10>20>30	6,66E-04	3,89	Dihydrolipoamide acetyltransferase precursor,putative	E9AT43	35	3(1)	7	6,46/7,60	49/49
733	7,23E-02	3,65E-01	2,24E-01	2,39E-01	R0<10>20<30	4,90E-04	5,05	Putative glucose-regulated protein 78	E9AZT9	1044	37(26)	38	5,20/5,18	67/72
735	3,02E-02	1,42E-01	1,46E-01	1,41E-01	R0<10<20>30	9,57E-05	4,84	Putative glucose-regulated protein 78	E9AZT9	794	27(22)	28	5,15/5,18	67/72
739	4,66E-02	7,71E-02	8,72E-02	9,55E-02	R0<10<20<30	3,70E-04	2,05	Hs1vu complex proteolytic subunit-like,hs1vu complex proteolytic subunit-like, threonine peptidase, Clan T(1), family T1B	E9AT11	61	4(1)	9	5,24/6,09	22/25
742	5,79E-03	3,36E-02	2,57E-02	1,04E-02	R0<10>20>30	2,00E-04	5,80	Calpain-like cysteine peptidase	E9AUQ7	102	2(2)	3	4,84/4,39	97/105
743	7,72E-03	4,45E-02	2,77E-02	1,89E-02	R0<10>20>30	7,22E-04	5,76	Calpain-like cysteine peptidase	E9AUQ7	29	5(1)	5	4,81/4,39	97/105
745	1,75E-01	5,19E-01	6,78E-01	4,15E-01	R0<10<20>30	2,22E-06	3,87	Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial; Flags: Precursor	P12076	832	17(17)	18	5,54/5,52	67/69
759	7,26E-02	2,69E-02	3,41E-02		R0>10<20	6,82E-04	2,70	Não identificado						
762	2,81E-02	2,96E-02	2,00E-02	7,15E-02	R0<10>20<30	4,70E-03	3,57	Conserved hypothetical protein	E9APL2	96	4(4)	21	4,65/4,81	22/22
764	1,12E-01	4,96E-02	7,60E-02	7,27E-02	R0>10<20>30	2,11E-03	2,26	Conserved hypothetical protein	E9AL39	144	7(5)	19	5,58/5,45	25/27
767	1,54E-02	2,15E-02	2,63E-02	3,51E-02	R0<10<20<30	1,63E-03	2,27	6-phosphogluconolactonase	E9AYQ1	98	2(2)	8	5,50/5,22	26/29
770		6,89E-02	3,54E-02	3,31E-02	R10>20>30	1,02E-04	2,08	Chain a, x-ray crystal structure of apo prostaglandin f synthase from leishmania major friedlin	P22045	239	7(5)	15	6,02/5,86	30/32
772		2,53E-02	1,26E-02		R20>30	1,20E-04	2,00	Não identificado						
775		2,55E-02	5,40E-02	4,72E-02	R10<20>30	5,33E-06	2,12	Conserved hypothetical protein	E9B5K5	40	2(1)	9	5,62/5,51	31/35
776	7,58E-02	4,37E-02	3,39E-02	2,70E-02	R0>10>20>30	9,87E-04	2,81	Enolase	E9APW3	159	4(3)	13	5,80/5,48	30/47



777	4,10E-02	4,17E-02	8,61E-02	R10<20<30	1,99E-05	2,10	Putative 3,2-trans-enoyl-coa isomerase, mitochondrial precursor	E9B226	113	5(3)	17	5,79/6,86	34/39	
780	1,71E-01	5,62E-02	5,38E-02	R10>20>30	3,78E-04	3,18	Arginase	Q6TUJ5	543	17(14)	35	6,34/6,01	36/37	
786	4,31E-02	1,38E-02	1,41E-02	R10>20<30	1,09E-03	3,12	Não identificado							
787	6,05E-02	2,32E-02	2,05E-02	R10>20>30	1,50E-05	2,95	Não identificado							
788	8,98E-02	1,80E-02	3,74E-02	R10>20<30	3,22E-06	5,00	Hypothetical protein, conserved	A4HC49	30	2(1)	0	6,27/5,67	36/198	
792	3,42E-02	3,29E-02	1,69E-02	R10>20>30	1,70E-06	2,03	Conserved hypothetical protein	E9AV52	38	2(1)	0	6,79/4,86	42/361	
795	4,39E-02	1,80E-02	1,41E-02	R10>20>30	2,50E-05	3,12	Putative proteasome regulatory atpase subunit 5	E9AVP4	63	2(2)	3	5,75/5,67	44/50	
797	9,68E-02	2,15E-01	2,28E-01	2,40E-01	R0<10<20<30	5,10E-03	2,48	Putative vacuolar ATP synthase subunit b	E9B064	1277	38(31)	65	5,93/5,72	48/56
803	4,87E-02	2,24E-02	4,44E-02	R10>20<30	1,74E-03	2,18	Putative T-complex protein 1, beta subunit	E9AZ29	305	21(13)	29	6,19/5,88	50/58	
807	3,57E-02	1,45E-02	1,75E-02	R10>20<30	3,53E-05	2,46	Conserved hypothetical protein	E9B1E2	255	8(7)	14	5,70/5,71	51/51	
809	1,80E-02	6,56E-02	4,22E-02	3,70E-02	R0<10>20>30	8,15E-03	3,65	Adenosylhomocysteinase; adohcyase; S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	P36889	82	1(1)	2	5,52/5,75	62/48
811	7,94E-02	2,74E-02	4,04E-02	R10>20<30	2,82E-06	2,89	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	E9AUA1	359	14(9)	18	5,55/5,37	58/61	
812	5,09E-02	1,03E-01	6,09E-02	4,84E-02	R0<10>20>30	8,27E-03	2,13	Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial; Flags: Precursor	P12076	381	7(5)	8	5,62/5,52	61/69
815	2,76E-02	1,34E-01	1,15E-01	1,41E-01	R0<10>20<30	1,23E-05	5,09	Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	E9ASX7	707	18(14)	26	5,33/5,13	57/61
816	2,81E-02	9,77E-03		R10>20	1,53E-05	2,88	Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial; Flags: Precursor	P12076	131	3(2)	7	5,46/5,52	59/69	
817	3,17E-02	1,04E-01	2,55E-02	2,93E-02	R0<10>20<30	5,31E-03	4,09	Putative alanyl-trna synthetase	E9AVY6	40	4(3)	4	5,72/5,52	61/107
819	5,84E-02	1,90E-02	1,23E-02		R0>10>20	1,44E-03	4,76	Putative protein kinase A regulatory subunit	E9AP50	70	1(1)	2	4,84/4,79	61/57
821	3,04E-02	1,22E-01	5,21E-02	4,88E-02	R0<10>20>30	1,90E-04	4,01	Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3	E9AYD6	891	35(19)	29	5,69/5,61	67/78
822	1,38E-02	2,58E-02	1,26E-02	1,08E-02	R0<10>20>30	4,03E-03	2,38	Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3	E9AYD6	165	6(4)	6	5,75/5,61	68/78
824	1,59E-02	2,13E-02	5,53E-03	R10<20>30	8,17E-05	3,86	Conserved hypothetical protein	E9APL9	57	3(2)	6	6,06/5,66	76/75	
827	3,78E-02	2,72E-02	1,83E-02	R10>20>30	4,15E-06	2,07	Putative cytosolic malate dehydrogenase	E9B0A8	63	9(2)	30	6,33/5,92	32/35	
833	1,43E-02	4,89E-02	1,99E-02	2,12E-02	R0<10>20<30	1,60E-04	3,43	Putative eukaryotic release factor 3	E9ANQ6	49	3(1)	4	6,31/7,02	46/85
834	4,32E-02	2,36E-02	1,30E-02	R10>20>30	1,92E-04	3,33	Não identificado							
837	1,60E-02	4,52E-02	1,99E-02	R10<20>30	2,37E-05	2,83	Não identificado							
838	3,02E-02	1,03E-02	2,23E-02	R10>20<30	1,08E-05	2,94	Putative calpain-like cysteine peptidase	E9B1J0	77	8(3)	9	4,96/4,96	91/90	

840	7,84E-03	1,74E-02	8,16E-03	R10<20>30	7,88E-05	2,22	Conserved hypothetical protein	E9B1R2	37	1(1)	0	5,12/10,48	72/123	
841	2,80E-01	2,29E-01	6,74E-02	R10>20>30	9,19E-03	4,16	Elongation factor 1-alpha	E9ARD0	128	6(5)	16	4,86/9,03	43/50	
842	7,00E-03	1,13E-02	2,33E-02	R10<20<30	1,53E-03	3,32	Não identificado							
843	6,98E-03	5,68E-03	1,71E-02	R10>20<30	1,02E-04	3,00	Putative ubiquitin-activating enzyme e1	E9AW70	41	1(1)	1	5,32/5,49	85/116	
848	1,15E-02	7,38E-02	2,99E-02	4,60E-02	R0<10>20<30	1,32E-05	6,41	Paraflagellar rod protein 2C	E9AQV6	92	10(3)	17	5,31/5,73	67/77
850	4,00E-02	6,16E-02	2,53E-02	R10<20>30	3,55E-05	2,44	Conserved hypothetical protein	E9AV52	38	1(1)	0	6,73/4,86	15/361	
855	1,86E-02	2,57E-02	1,26E-02	R10<20>30	2,56E-07	2,05	Não identificado							
859	1,51E-01	5,83E-02	8,21E-02	1,44E-01	R0>10<20<30	5,13E-03	2,59	Putative heat-shock protein hsp70	E9B099	180	6(5)	7	4,41/5,34	62/71
865	1,53E-02	5,34E-02	3,85E-02	6,13E-02	R0<10>20<30	3,61E-03	4,00	Succinyl-coa ligase [GDP-forming] beta-chain,putative	E9AT73	58	2(1)	7	6,20/6,77	38/45
868	5,54E-02	2,35E-02	3,16E-02	R10>20<30	2,19E-04	2,35	Putative calpain-like cysteine peptidase	E9AK26	229	16(7)	21	4,87/4,95	118/89	
870	1,36E-02	2,47E-02	1,18E-02	R10<20>30	9,49E-05	2,11	Conserved hypothetical protein	E9AV52	31	1(1)	0	5,26/4,86	62/361	
879	5,35E-02	1,84E-02	2,90E-02	R10>20<30	3,64E-03	2,90	Putative heat shock protein	E9ARS1	528	26(17)	26	5,19/5,09	91/93	
883	1,12E-02	3,67E-02	1,32E-02	1,62E-02	R0<10>20<30	1,28E-03	3,28	Putative paraflagellar rod protein 1D	E9ALP7	88	3(1)	2	5,28/5,36	73/69
888	2,09E-02	8,92E-03	1,48E-02	R10>20<30	1,27E-05	2,34	Cysteine peptidase, Clan CA, family C19,putative	E9ALJ4	43	2(2)	1	5,60/5,38	84/84	
894	4,76E-02	5,16E-02	1,72E-02	1,77E-02	R0<10>20<30	1,76E-05	2,99	Não identificado						
899	2,72E-02	3,63E-02	4,74E-02	1,11E-01	R0<10<20<30	3,94E-04	4,10	Alpha tubulin	E9AP62	264	7(4)	16	4,89/5,45	31/61
903	3,69E-01	1,48E-01	1,83E-01	2,70E-01	R0>10<20<30	1,23E-03	2,50	Conserved hypothetical protein	E9AT17	34	2(1)	3	4,07/4,24	56/47
904	1,12E-01	5,16E-02	1,20E-01	5,19E-02	R0>10<20>30	4,85E-03	2,32	Conserved hypothetical protein	E9AQB9	32	2(2)	1	4,06/8,27	54/60
905	9,86E-03	2,78E-02	2,70E-02	2,00E-02	R0<10>20>30	1,58E-03	2,82	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	E9B4H4	145	5(4)	12	6,16/5,98	57/64
909	1,79E-02	1,32E-02	7,48E-03	R10>20>30	2,32E-03	2,40	Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial; Flags: Precursor	P12076	41	3(3)	5	6,30/5,52	63/69	
911	1,30E-02	1,34E-02	5,33E-03	R10<20>30	2,17E-05	2,51	Não identificado							
912	1,43E-02	1,23E-02	4,18E-03	R10>20>30	1,18E-04	3,42	Não identificado							
913	1,43E-02	1,21E-02	4,99E-02	1,26E-02	R0>10<20>30	3,14E-03	4,14	Putative small GTP-binding protein Rab1	E9AYX8	50	2(1)	18	5,10/5,54	18/22
914	2,70E-02	5,34E-02	3,35E-02	2,02E-02	R0<10>20>30	8,39E-03	2,64	Putative spermidine synthase	E9AK40	52	1(1)	8	5,86/5,08	22/31
915	3,78E-02	5,55E-02	2,63E-02	R10<20>30	1,59E-06	2,11	Não identificado							

916	7,11E-02	5,93E-02	9,60E-03	R10>20>30	4,18E-07	7,41	Tyrosyl or methionyl-trna synthetase-like protein	E9AQS3	303	8(7)	41	6,83/5,50	26/20	
917	6,20E-02	3,59E-02	1,39E-02	R10>20>30	2,26E-05	4,46	Putative RNA-binding protein	E9B699	26	3(1)	21	6,86/7,85	30/30	
918	1,41E-02	1,39E-02	3,69E-02	1,10E-02	R0>10<20>30	5,83E-03	3,35	Heat shock protein 83; HSP 83	P27741	85	2(2)	1	6,07/5,00	30/81
920	5,03E-02	2,01E-02	9,46E-03	R10>20>30	3,17E-06	5,32	Pyruvate kinase, partial	E9B5P0	61	4(3)	21	6,54/5,81	51/29	
921	4,16E-02	2,21E-02	1,08E-02	R10>20>30	1,23E-05	3,85	Putative T-complex protein 1, eta subunit	E9B6R4	201	11(5)	23	6,58/6,59	57/62	
922	6,49E-02	1,40E-02		R10>20	6,94E-04	4,65	Putative T-complex protein 1, eta subunit	E9B6R4	729	23(19)	38	6,87/6,59	58/62	
923	1,12E-02	2,09E-02	4,40E-03	R10<20>30	6,41E-10	4,76	Não identificado							
924	1,84E-02	2,32E-02	8,63E-03	R10<20>30	1,04E-04	2,69	Não identificado							
925	2,47E-02	1,55E-02	9,03E-03	R10>20>30	1,31E-04	2,74	Putative arginyl-trna synthetase	E9AZ37	87	7(2)	8	6,52/6,20	70/79	
927	1,25E-02	4,07E-03		R10>20	3,35E-05	3,07	Putative ubiquitin-activating enzyme e1	E9AW70	73	3(3)	2	5,61/5,49	108/116	
928	1,98E-02	8,12E-03	7,74E-03	R10>20>30	3,23E-05	2,55	Não identificado							
929	1,26E-02	4,84E-03	8,17E-03	R10>20<30	1,39E-05	2,59	Conserved hypothetical protein	E9AV52	34	1(1)	0	5,77/4,86	72/361	
932	2,47E-02	1,05E-02	1,44E-02	R10>20<30	1,36E-05	2,35	Conserved hypothetical protein	E9AR75	30	1(1)	1	5,24/8,91	48/88	
933	4,83E-02	1,95E-02	9,10E-03	R10>20>30	3,74E-04	5,31	Não identificado							
934	3,96E-02	1,30E-02		R10>20	1,27E-05	3,04	Putative succinate dehydrogenase flavoprotein	E9AX08	87	2(2)	2	6,51/6,50	62/68	
937	1,96E-02	7,04E-03		R10>20	3,25E-04	2,78	Não identificado							
939			3,88E-02	Somente R30	1,45E-13		Conserved TPR domain protein	E9B146	138	6(3)	0,11	5,26/5,19	28/45	
940			4,75E-02	Somente R30	3,12E-11		Actin	P45520	121	4(3)	16	5,55/5,40	39/42	
941			1,95E-02	Somente R30	2,37E-07		Não identificado							
942			8,55E-02	Somente R20	2,73E-08		Não identificado							
943			5,06E-02	Somente R20	1,84E-04		Não identificado							
944			2,21E-01	Somente R20	9,22E-04		Heat shock protein 83-1	E9B3L2	174	7(3)	11	4,64/5,04	71/81	
945			1,56E-01	Somente R20	2,09E-06		Não identificado							
947			8,72E-02	Somente R10	1,15E-07		Histone H2B	E9AMY6	51	2(2)	19	4,27/11,25	12/12	
948			1,84E-02	Somente R10	3,72E-03		Conserved hypothetical protein	E9AV52	28	1(1)	0	5,56/4,86	78/361	
949			1,02E-02	Somente R10	9,34E-08		Putative kinesin	E9AQX1	27	1(1)	1	5,57/8,15	95/119	

950	1,56E-02	Somente R10	5,17E-08	Cysteine peptidase, Clan CA, family C19, putative	E9ALJ4	84	1(1)	1	5,62/5,38	95/84
951	2,44E-02	Somente R10	4,53E-04	Não identificado						
952	1,75E-02	Somente R10	1,11E-04	Putative 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocystei nemethyltransferase	E9B1E9	29	2(1)	1	5,79/5,77	82/87
953	1,40E-02	Somente R10	2,45E-07	Não identificado						
954	1,17E-02	Somente R10	1,07E-08	Não identificado						
955	8,22E-03	Somente R10	1,46E-06	Não identificado						
956	1,72E-02	Somente R10	1,37E-03	Não identificado						
957	3,15E-02	Somente R10	1,19E-03	Conserved hypothetical protein	E9AV52	27	1(1)	0	5,22/4,86	57/361
959	4,95E-02	Somente R10	4,76E-03	Heat shock 70 kda protein	P17804	140	6(4)	7	4,92/5,35	41/71
960	1,82E-02	Somente R10	2,02E-06	Conserved hypothetical protein	E9B643	32	1(1)	1	6,31/6,69	69/75
961	1,56E-01	Somente R10	8,90E-03	Putative dihydrolopoamide dehydrogenase	E9B3B4	27	5(1)	12	6,63/6,71	50/51
962	2,39E-02	Somente R10	4,17E-04	Putative T-complex protein 1, gamma subunit	E9AWE0	74	5(2)	11	6,12/5,80	53/61
963	6,09E-02	Somente R10	2,52E-05	Elongation factor 1-alpha	E9ARD0	110	5(4)	13	4,83/9,03	31/50
964	2,33E-02	Somente R10	3,62E-05	Putative tyrosine aminotransferase	E9AT13	106	5(3)	16	5,50/5,41	42/50
965	4,11E-02	Somente R10	1,25E-06	Flagellar protofilament ribbon protein-like protein	E9ANC9	26	1(1)	2	6,77/7,66	42/47
966	1,92E-02	Somente R10	1,86E-05	Elongation factor 1-alpha	E9ARD0	46	2(1)	7	5,75/9,03	46/50
967	3,88E-02	Somente R10	2,85E-12	Conserved hypothetical protein	E9AV52	35	1(1)	0	5,16/4,86	49/361
968	1,31E-01	Somente R10	1,57E-05	Metallo-peptidase, Clan MF, Family M17	E9ANK8	151	5(4)	8	6,51/6,34	55/58
969	2,39E-02	Somente R10	5,39E-07	Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor, putative	E9B2W2	85	2(2)	3	5,93/6,20	58/65
970	2,62E-02	Somente R10	3,65E-10	Não identificado						
971	2,82E-02	Somente R10	1,61E-05	Calpain-like cysteine peptidase	E9AUQ7	27	3(1)	3	4,68/4,39	111/105
972	1,80E-02	Somente R10	6,95E-06	Não identificado						
973	1,43E-01	Somente R0	7,34E-04	Histone H3	E9AN97	81	3(2)	10	4,27/11,17	12/15
975	1,24E-01	Somente R0	3,66E-04	Putative dihydrolopoamide dehydrogenase	E9B3B4	103	4(2)	6	4,46/6,71	49/51
976	3,82E-02	Somente R0	3,32E-09	Não identificado						
977	8,99E-02	Somente R0	6,31E-09	Actin	P45520	110	7(4)	23	5,55/5,40	30/42
978	3,05E-02	Somente R0	1,50E-09	Não identificado						

#### **9.4. Artigo publicado**



# Identification of Differentially Expressed Proteins from *Leishmania amazonensis* Associated with the Loss of Virulence of the Parasites

Rubens D. M. Magalhães<sup>1</sup>, Mariana C. Duarte<sup>2</sup>, Eliciane C. Mattos<sup>3</sup>, Vivian T. Martins<sup>1</sup>, Paula S. Lage<sup>2</sup>, Miguel A. Chávez-Fumagalli<sup>2</sup>, Daniela P. Lage<sup>4</sup>, Daniel Menezes-Souza<sup>5</sup>, William C. B. Régis<sup>6</sup>, Maria J. Manso Alves<sup>3</sup>, Manuel Soto<sup>7</sup>, Carlos A. P. Tavares<sup>1</sup>, Ronaldo A. P. Nagen<sup>1</sup>, Eduardo A. F. Coelho<sup>2,4\*</sup>

**1** Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Ciências Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **3** Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **5** Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **6** Departamento de Bioquímica, PUC Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **7** Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

## Abstract

**Background:** The present study analyzed whether or not the *in vitro* cultivation for long periods of time of pre-isolated *Leishmania amazonensis* from lesions of chronically infected BALB/c mice was able to interfere in the parasites' infectivity using *in vivo* and *in vitro* experiments. In addition, the proteins that presented a significant decrease or increase in their protein expression content were identified applying a proteomic approach.

**Methodology/Principal Findings:** Parasites were cultured *in vitro* for 150 days. Aliquots were collected on the day 0 of culture (R0), as well as after ten (R10; 50 days of culture), twenty (R20; 100 days of culture), and thirty (R30; 150 days of culture) passages, and were used to analyze the parasites' *in vitro* and *in vivo* infectivity, as well as to perform the proteomic approach. Approximately 837, 967, 935, and 872 spots were found in 2-DE gels prepared from R0, R10, R20, and R30 samples, respectively. A total of 37 spots presented a significant decrease in their intensity of expression, whereas a significant increase in protein content during cultivation could be observed for 19 proteins (both cases >2.0 folds). Some of these identified proteins can be described, such as diagnosis and/or vaccine candidates, while others are involved in the infectivity of *Leishmania*. It is interesting to note that six proteins, considered hypothetical in *Leishmania*, showed a significant decrease in their expression and were also identified.

**Conclusions/Significance:** The present study contributes to the understanding that the cultivation of parasites over long periods of time may well be related to the possible loss of infectivity of *L. amazonensis*. The identified proteins that presented a significant decrease in their expression during cultivation, including the hypothetical, may also be related to this loss of parasites' infectivity, and applied in future studies, including vaccine candidates and/or immunotherapeutic targets against leishmaniasis.

**Citation:** Magalhães RDM, Duarte MC, Mattos EC, Martins VT, Lage PS, et al. (2014) Identification of Differentially Expressed Proteins from *Leishmania amazonensis* Associated with the Loss of Virulence of the Parasites. PLoS Negl Trop Dis 8(4): e2764. doi:10.1371/journal.pntd.0002764

**Editor:** Diane McMahon-Pratt, Yale School of Public Health, United States of America

**Received:** September 20, 2013; **Accepted:** February 16, 2014; **Published:** April 3, 2014

**Copyright:** © 2014 Magalhães et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from Pró-Reitoria de Pesquisa de UFMG (Edital 03/2013), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica, FAPEMIG (CBB-APQ-00496-11 and CBB-APQ-00819-12), and CNPq (472090/2011-9 and 482976/2012-8). EAF is a grant recipient of CNPq. MACF is a grant recipient of PNP/CAPE. This study was also, in part, supported in Spain by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación FIS/PI1100095. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

## Introduction

Leishmaniasis consists of a wide range of diseases present in 98 countries worldwide, where approximately 1.6 million cases occur each year, with an estimated 40,000 deaths [1]. Many geographic regions are endemic for multiple *Leishmania* species, which is the case in Brazil, where the disease is caused by at least six different species of *Leishmania*. Among them, *Leishmania amazonensis* presents

a particular importance, as it is one of the main species capable of causing human disease with a broad spectrum of clinical manifestations, ranging from cutaneous to visceral leishmaniasis [2,3]. In one study, it was also observed that BALB/c mice experimentally infected with *L. amazonensis* developed visceralization of the parasites in different organs, such as the brain, liver, spleen, and bone marrow, characterizing a diagnosis of murine visceral leishmaniasis [4].

## Author Summary

*Leishmania amazonensis* can induce a diversity of clinical manifestations in mammal hosts, including tegumentary and visceral leishmaniasis. The present study evaluated the variation of infectivity of *L. amazonensis*, which was pre-isolated from lesions of chronically infected mice and *in vitro* cultured for 150 days, in turn connecting these results with the profile of parasite protein expression using a proteomic approach. Parasites were recovered after the first passage, as well as after 50, 100, and 150 days of axenic cultures, and were subsequently evaluated. A total of 37 proteins presented a significant decrease, whereas 19 proteins presented a significant increase in their protein expression content in the assays (both cases >2.0 fold). Some of the identified proteins have been reported in prior literature, including diagnosis and/or vaccine candidates for leishmaniasis, while others proved to be involved in the infectivity of *Leishmania*. It is interesting to note that proteins related to the parasites' metabolism were also the majority of the proteins identified in the old cultures of *L. amazonensis*, suggesting a possible relation between the metabolic state of parasites and their possible loss of infectivity. In conclusion, the proteins identified in this study represent a contribution to the discovery of new vaccine candidates and/or immunotherapeutic targets against leishmaniasis.

It has been postulated that the *in vitro* maintenance of parasites by cultivation over long periods of time may well diminish their ability to differentiate into amastigote forms [5]. In fact, long-term axenic cultures were one of the first empirical approaches to efficiently identify parasite virulence genes, which later led to the experimental development of attenuated strains [6]. Similarly, the long-term *in vitro* growth of drug-resistant parasites was suggested to mediate the loss of resistance phenotype [7]. It is well-known that parasites can regulate their gene expression, mainly at the post-transcriptional level; however, little is known about the biological mechanisms and the protein expression involved in this process [8]. In this context, the identification of proteins involved either in the infectivity of parasites in the mammal hosts, or in their maintenance in axenic cultures, should be considered relevant.

The proteomic study applied to evaluate the protein expression patterns in *Leishmania* offers the possibility of assigning potential functions for proteins, including those previously identified by genomics as hypothetical, which should be evaluated, such as vaccine candidates, diagnostic markers, and/or immunotherapeutic targets. Several studies have been published evaluating the stage-specific expression and differentiation profiles of proteins in different *Leishmania* species [9,10,11,12,13,14]. In addition, the discovery of new proteins through proteomics has been recommended as one of the main research priorities for further development and improvement of leishmaniasis vaccines [15].

In this context, the identification of proteins involved in parasites' infectivity should be considered important, given that they could be used in immunological applications to prevent the disease. In the present study, a proteomic approach, based on two-dimensional electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry, was carried out to analyze the variation of protein expression profiles in stationary promastigotes of *L. amazonensis*, which were pre-isolated from lesions of chronically infected BALB/c mice and maintained in axenic cultures over a long period of time. The proteins that presented significant variations in their levels during the *in vitro* cultivation were identified in an attempt to select new

vaccine candidates and/or immunotherapeutic targets against leishmaniasis. The results showed several known, as well as six hypothetical, *L. amazonensis* proteins, some of which are well-known proteins involved in the infectivity of *Leishmania*, while others are described through the metabolic functions of the parasites.

## Materials and Methods

### Ethics statement

Experiments were performed in compliance with the National Guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee for the Ethical Handling of Research Animals (CEUA) from the Federal University of Minas Gerais (UFMG) (Law number 11.794, 2008), which approved this study on April 25, 2012, under protocol number 092/2012.

### Mice and parasites

Female BALB/c mice (8 weeks of age) were obtained from the breeding facilities of the Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, UFMG, and were maintained under specific pathogen-free conditions. *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8) parasites were grown at 24°C in complete Schneider's medium, supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 20 mM L-glutamine, 200 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 50 µg/ml gentamicin, at pH 7.4. The amastigote-like cells were obtained as described in [16].

### *In vivo* infection

BALB/c mice (n = 8) were infected subcutaneously in their hind footpad with  $1 \times 10^6$  stationary promastigotes of *L. amazonensis*. The course of the disease was monitored at weekly intervals by measuring footpad thickness with a metric caliper, and expressed as the increase in thickness of the infected footpad compared to the non-infected footpad. At week 8 post-infection, animals were sacrificed and their infected footpads, spleen, and liver were harvested for parasite quantification by a limiting-dilution assay [17]. To evaluate the *in vivo* infectivity of parasites in the different collected passages, R0 and R30 samples were used to infect BALB/c mice (n = 8, each group). The infection schedule and the parasitological analyses were the same as described above.

### Preparation of the parasites for proteomics

Parasites were collected from infected footpads of the animals (8 weeks after infection) and purified to perform the proteomic approach. For this, parasites recovered from lesions were homogenized and immediately washed in Schneider's medium, which was supplemented with 10% FBS and 1% penicillin G/streptomycin sulfate solution, and subsequently cultured in complete Schneider's medium. Passages of *in vitro* cultures were performed every five days, until the thirtieth passage (150 days after). Aliquots were collected on day 0 of culture (R0, first passage), as well as 50 (R10), 100 (R20) and 150 (R30) days after the beginning of the cultures, and quantified for the experiments.

### Evaluation of *in vitro* infectivity

Aliquots containing parasites of R0, R10, R20, and R30 passages were centrifuged for 10 min and  $5,000 \times g$ , at 4°C. The supernatant was removed, and the pellet containing the parasites was washed 3 times with sterile PBS. Murine macrophages collected from BALB/c mice were plated on round glass coverslips within the wells of a 24-well culture plate, at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells per coverslip in RPMI 1640 medium, which was

supplemented with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 200 U/mL penicillin G, and 100 µg/mL streptomycin sulfate, at pH 7.4. After 2 h of incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, stationary promastigotes of *L. amazonensis* were quantified and added to the wells (1×10<sup>6</sup> and 5×10<sup>6</sup>, for a ratio of 1:2 or 1:10 macrophage per parasites, respectively). The cultures were incubated for 24 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Next, the cells were washed and stained to determine the percentages of infected macrophages and the number of intra-macrophage amastigotes by counting 200 cells in triplicate [18]. An optical microscopy was also used to check the stationary profile of all *in vitro* cultures, and a prior titration curve was performed to determine the best time of infection for the macrophages (data not shown).

### Preparation of total extract of *Leishmania*

The total extraction of proteins of *L. amazonensis* was performed following a technical protocol [19]. Briefly, 2×10<sup>8</sup> stationary promastigotes were dissolved in a DeStreak rehydration solution, containing phosphatases (5 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and 50 mM Na β-glycerophosphate) and proteases (Protease Inhibitor Cocktail; plus 1 mM PMSF) inhibitors. After homogenization, samples were disrupted by sonication in an ice bath for 15 min by applying a continuous pulse and centrifuged at 20,000× *g* for 7 min, at 4°C. The supernatant was collected, and the protein concentration was estimated using the Bradford method [20]. Aliquots were immediately frozen at −80°C, until use. For each passage, cellular material was extracted from the parasites harvested from two different animals, and two independent culture bottles of each animal were grown separately, totaling four individual samples.

### Isoelectric focusing

The isoelectric focalization (IEF) was performed using the Ettan IPGphor3 system. For the first-dimension electrophoresis, 650 µg of total extracts were added to a volume of 250 µL with a rehydration solution containing a DeStreak rehydration solution in 1% immobilized pH gradient buffer (IPG-buffer, pH 4–7). Next, samples were applied to IPG strips (13 cm, pH 4–7; GE Healthcare) for passive rehydration for 18 h at room temperature. After gel rehydration, IEF was performed at 1,000 V for 800 V/h; 8,000 V for 11,500 V/h; holding at 8,000 V for 7,500 V/h.

### SDS-PAGE

After IEF, each strip was incubated for 15 min with 1% dithiothreitol (DTT) in the equilibrium buffer [75 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8; 6 M urea, 39% (v/v) glycerol, and 2% (w/v) SDS], followed by a second incubation step for 15 min in 2.5% iodoacetamide diluted in equilibrium buffer. IPG strips were washed with milli-Q water, transferred to a 12% polyacrilamide, and sealed with an agarose solution (0.5% agarose in running buffer, containing 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 0.1% SDS, pH 8.3). The protein standard was purchased from BioRad (pre-stained SDS-PAGE broad range). Electrophoresis was performed using a SE 600 ruby standard dual cooled vertical unit system connected to a MultiTemp III cooling bath. Proteins were separated at 30 mA/gel.

### Protein digestion, peptide extraction, and spot handling

The 2-DE gels were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250, following a defined technical procedure [21]. For image analysis, 16 stained gels were scanned using an ImageScanner III. Analyses were carried out using ImageMaster 2D Platinum 7.0 software. This software identifies spots on a gel image

(300 dpi) by comparing the number of pixels in the background image to the number of pixels that make up the image of the spot itself. The spots present in the images are differentiated from other gels by determining the spot's position through the manual insertion of image markers. The parameters used for spot detection included: minimal area of 5 pixels, with a smooth factor of 4 and a saliency of 80. The reference gel (higher number of spots) was used to match corresponding protein spots within different gels. The intensity volume of individual spots was normalized by the total intensity volume (value of the intensity volumes obtained from all spots in the same 2-DE gel) so as to remain relatively independent of variations due to protein loading and staining, performed by considering the total volume of all spots in the images. All of the spots selected by software were checked manually. The statistical test of analysis of variance (One-way ANOVA) was performed at a 1% statistical significance level ( $P < 0.01$ ) to determine the mean values of spot intensity for each passage (R0, R10, R20, and R30) in an attempt to determine the significant changes among the passages. Additionally, this study applied a cut-off of at least 2-fold of the core value of intensity of all spots selected by the program, which were the same in each passage. The obtained fold value was the number obtained by the ratio between the higher and lower core values of each spot's passage. Spots that presented significant variations within the passages were manually excised and destained with a solution containing 50% methanol and 2.5% acetic acid. The proteins were reduced in 10 mM DTT and alkylated using 50 mM iodoacetamide. Limited protein enzymatic digestion was performed with 0.4 or 0.8 µg of trypsin for larger spots. Excess protease was removed and replaced by 25 mM ammonium bicarbonate. Digestion was performed at 37°C for 18 h. Peptide extraction was performed twice for 15 min, using 30 µL of a solution containing 50% acetonitrile and 5% formic acid. The digested samples were dried using a speed-vac.

### Protein identification and database search

The identification of proteins was performed at the Mass Spectrometry Laboratory of the Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio, CNPEM/ABTLuS, Campinas, São Paulo, Brazil). This procedure was conducted using an ESI-Quad-TOF apparatus attached to a UPLC system. The mass spectra were processed by the Protein Lynx V 2.1 program and analyzed by the MASCOT MS/MS Ion Search program (<http://www.matrixscience.com>). The following parameters were used for this analysis: enzyme, trypsin; allowing of up to 1 missed cleavage; fixed modification, carbamidomethyl (C); variable modification, oxidation (M); peptide tolerance, ±0.1 Da; MS/MS tolerance, ±0.1 Da; and a peptide charge of 1+, 2+, and 3+. The database *Leishmania* (dated June 2012) was used for protein identification, the records of which can be found in the NCBI concerning *Leishmania spp.* (49,496 sequences; 30,861,888 residues). All data regarding the proteins evaluated in the present study were harvested from NCBI, UniProt, and Gene Ontology databases.

### Immunoblotting 2-DE analysis

To validate the proteins identified in this study, such as the significant decrease or increase in their expression content after cultivation, Western blot experiments and 2-DE gel quantitation were performed. Whole cell extracts of stationary promastigotes and amastigotes-like forms of *L. amazonensis* were separated electrophoretically from R0 and R30 passages and transferred onto cellulose membranes (Schleicher & Schull, Dassel, Germany) by semi-dry blotting for 2 h at 400 mA. Membranes were blocked in 5% (w/v) low-fat dried milk diluted in TBS plus 0.05% Tween



20 for 16 h at 4°C. Next, the membranes were washed 3 times with a solution containing TBS and 0.05% Tween 20 (TBS-T, 10 min each) and were pre-incubated with anti- $\alpha$ -tubulin (1:1,000 dilution), anti-HSP83 (1:1,000 dilution), anti-GRP78 (1:2,000 dilution), or anti-parafagellar rod protein 1D (1:2,000 dilution) antibodies for 2 h at room temperature. After, membranes were washed 6 times with TBS-T (10 min each) and incubated with a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:40,000 dilution) for 2 h at room temperature. After having been washed 7 times with TBS-T (10 min each), the reaction was processed using ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagent and ImageQuant LAS4000 equipment. The Ponceau S staining of each membrane was used as a loading control (data not shown). The band intensity of each protein was quantified by Image J software. The normalized values were obtained in the comparison between R0 and R30 of each parasite stage. The experiments were performed in triplicate, and the Student's t-test ( $P < 0.05$ ) was employed in the statistical analyses.

### Statistical analysis

The statistical analysis of the *in vitro* and *in vivo* infectivity experiments was performed using the GraphPad Prism software (version 5.0 for Windows). The differences were evaluated by one-way ANOVA analysis, followed by the Bonferroni' test. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ . Statistical analyses evaluating the intensity and variation of the protein expression profile in the 2-DE gels and immunoblotting were also performed, as described above. The data are representative of three independent experiments, performed in triplicate, which presented similar results.

## Results

### Evaluation of *in vivo* and *in vitro* infectivity

BALB/c mice ( $n = 8$ ) subcutaneously infected with *L. amazonensis* were monitored for 8 weeks by measuring the footpad thickness, given that the footpad swelling was similar in all evaluated animals (Figure 1A). The number of parasites recovered in the infected footpads, spleen, and liver of the infected animals was evaluated, and the results showed values of  $8.6 \pm 0.5$ ,  $5.9 \pm 0.6$ , and  $4.9 \pm 0.6$  log, respectively (Figure 1B). In this context and due to the high homogeneity of infections in the mice, represented by similar values of footpad swelling and parasite loads, the parasites were recovered from lesions and used in the axenic cultures to perform the proteomic analyses of this study.

To evaluate the variation of the *in vivo* infectivity between the different passages of *L. amazonensis*, stationary promastigotes obtained from R0 and R30 samples were used to infect BALB/c mice ( $n = 8$  per group, with  $1 \times 10^6$  stationary promastigotes injected in each mouse). Animals infected with R30, as compared to the animals infected with R0, presented a significantly lower edema in the infected footpads at 8 weeks after infection (Figure 1C). The lower lesion size observed in the R30 group, when compared to the values obtained in the R0 group, was related to the lower parasite load observed when evaluating the infected footpads, spleen, and liver of these animals (Figure 1D).

For the evaluation of the *in vitro* infectivity, stationary promastigotes recovered in all passages (R0, R10, R20, and R30) were quantified and employed in the experiments. It could be observed that by using 2 parasites to infect 1 macrophage, parasites obtained from the R0 passage presented an infection average of  $65.1 \pm 1.5\%$  and a number of amastigotes per macrophage of  $2.2 \pm 0.1$ . By contrast, using the R30 sample, the infection average was  $14.9 \pm 2.3\%$  and the number of amastigotes

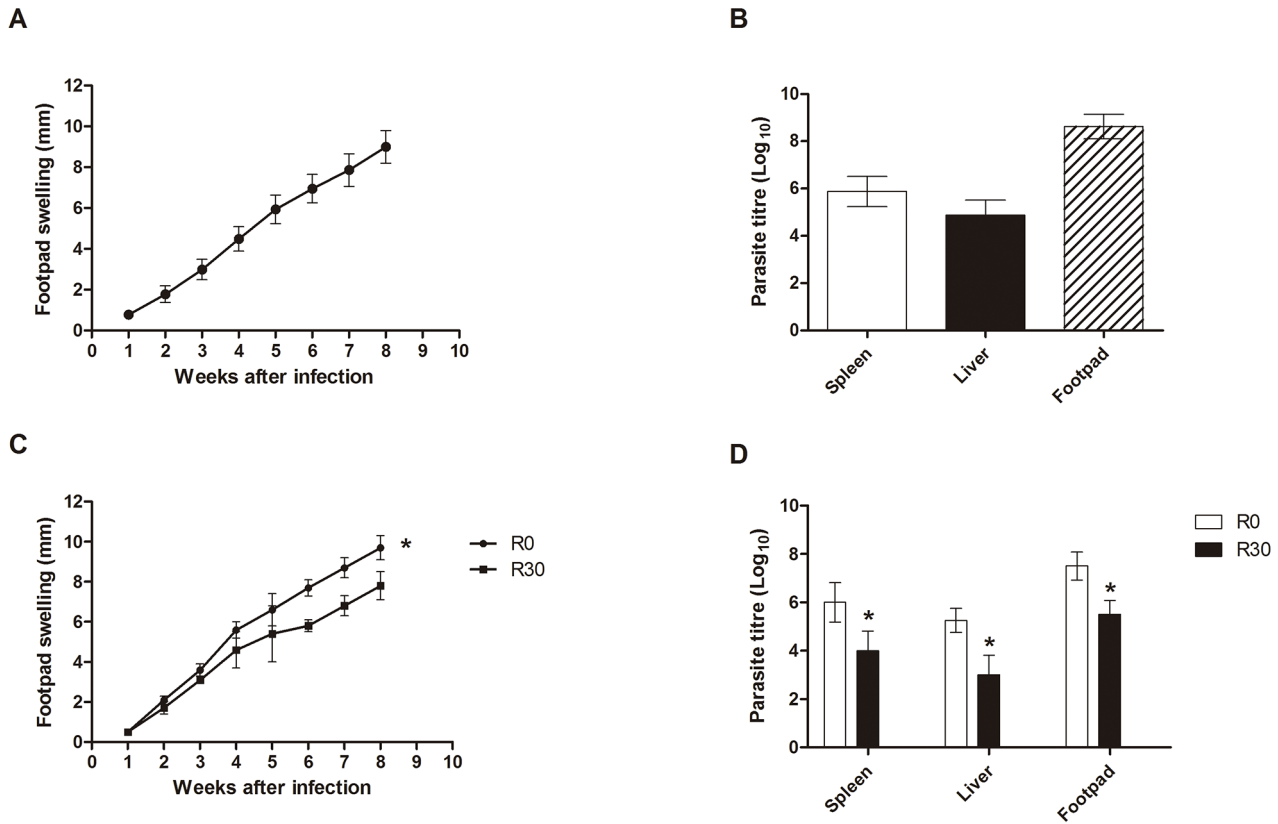
per macrophage was  $0.5 \pm 0.1$ . When 10 parasites were used to infect 1 macrophage, the infection average of the R0 group was  $96.9 \pm 2.6\%$  and the number of amastigotes per macrophage was  $7.4 \pm 0.4$ . On the other hand, using parasites from the R30 group, the infection average was  $59.5 \pm 2.2\%$  and the number of amastigotes per macrophage was  $3.8 \pm 0.4$  (Table 1).

### Analyses of protein expression in *Leishmania amazonensis*

Electrofocusing was performed using 13 cm pH 4–7 IPG strips after having investigated the best strip to isolate the total extracts. Strips of 13 cm were chosen because they provide a better range of separation of proteins by their  $pI$  without the gels becoming difficult to handling. Two ranges of pH were evaluated: 3–10 and 4–7. This study opted for a narrower pH range, given that most of the identified spots were located in this region. Although some spots located outside the pH 4–7 have been missed, the most spots were obtained within of this range due a better separation. After 2-DE gels had been applied, approximately 837 spots were found in the R0 sample, while 967, 935, and 872 spots were identified in the R10, R20, and R30 samples, respectively. Figure 2 is representative of the gels obtained in each condition. The 2-DE profiles and the number of observed spots in the different passages were reproducible in terms of both the total number of protein spots and their relative positions and intensities in four 2-DE gels performed for each passage (data not shown). After 2-DE analysis, 315 spots, which presented a significant variation in their intensities, were selected for identification by mass spectrometry. From all these spots, 258 were identified as proteins, and 164 unique proteins were identified. Of these, 58 proteins showed that the intensity of their corresponding spots either increased (19 spots) or decreased (37 spots) during the passages from R0 to R30, always maintaining a 2-fold minimal variation. It is also important to report that, upon performing the *in vitro* infection experiments, a stabilization of the infectivity could be observed between the R20 and R30 samples (Table 1).

### Identification of proteins of interest

Among the 37 proteins that presented a significant decrease in their content during the axenic passages, six were hypothetical, while another 31 were known proteins, like described in Table 2 [22–52]. Some of these proteins present biological functions described in prior literature, such as trypanothione peroxidase [25], metallo-peptidases [29], heat shock protein HSP70 [33], and protein disulfide isomerase [48], all of which are involved with the parasites' infectivity. Possible targets for therapeutic interventions, such as S-adenosylmethionine synthetase [47]; proteins identified as diagnosis candidates, such as acidic ribosomal protein P2; and vaccine candidates, such as the eukaryotic initiation factor 4A [34] and thiol-dependent reductase 1 [52], were also identified. Proteins involved in the flagellum motility in *Leishmania*, such as a small myristoylated protein [22], and others related to metabolic functions, such as aldehyde dehydrogenase [28], were also identified. Evaluating the proteins that presented a significant increase in their content, including one hypothetical and 18 known proteins, could be identified. Data are showed in Table 3 [53–70]. In relation to known proteins, the majority are commonly involved in the parasites' metabolism, such as nucleosome assembly proteins [57], 6-phosphogluconolactonase [62], and rieske iron sulfur proteins [66], while others, such as mannose-1-phosphate guanyltransferase [56] and short chain dehydrogenase [65], have been employed as candidates for immunotherapeutic targets.



**Figure 1. Infection of BALB/c mice.** Mice (n = 8) were infected subcutaneously with  $1 \times 10^6$  stationary promastigotes of *Leishmania amazonensis*. Lesion development in the infected footpads was monitored weekly, up to 8 weeks after infection. Mean  $\pm$  standard deviation (SD) are shown in (A). Parasite load in the infected footpads, spleen, and liver was analyzed in all animals (B). Other mice (n = 8, per group) were subcutaneously infected with  $1 \times 10^6$  stationary promastigotes of *L. amazonensis* obtained from R0 or R30 passages, and the lesion development was monitored up to 8 weeks after infection. Mean  $\pm$  SD of the groups are shown (C). The parasite load in the infected footpads, spleen, and liver was also evaluated in these groups (D). The experiments were repeated three times, and presented similar results. \*Significant difference between the R0 and R30 groups ( $P < 0.05$ ).  
doi:10.1371/journal.pntd.0002764.g001

**Immunoblotting validation**

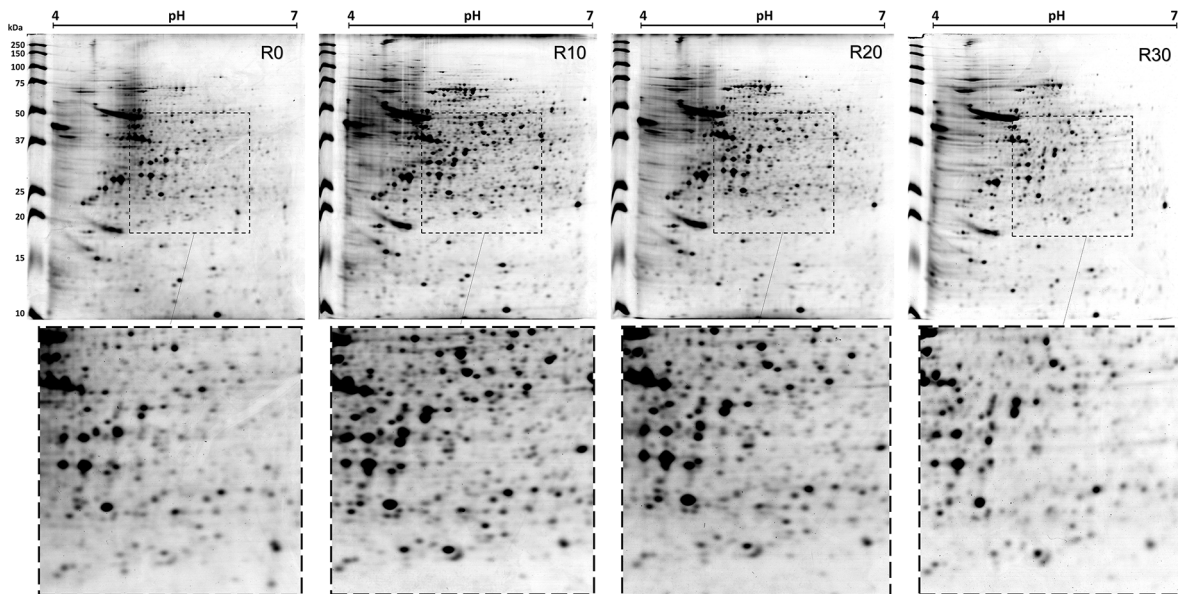
Some of the identified proteins that presented a significant increase or decrease in their contents in the axenic cultures were used to validate the results found in this study. In this context, two

of them presenting a significant decrease in their expression content, namely  $\alpha$ -tubulin and paraflagellar rod protein 1D, and two of them, which presented an increase in their expression, namely HSP83 and GRP78, were used in the Western blot

**Table 1. Evaluation of *in vitro* infection.**

Ratio	Percentage of infected macrophages			
	R0	R10	R20	R30
1:2	65.1 $\pm$ 1.5	37.8 $\pm$ 3.2	19.2 $\pm$ 3.6	14.9 $\pm$ 2.3
1:10	96.9 $\pm$ 2.6	82.8 $\pm$ 1.4	64.1 $\pm$ 2.5	59.5 $\pm$ 2.2
Ratio	Number of amastigotes per macrophage			
	R0	R10	R20	R30
1:2	2.2 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1
1:10	7.4 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.8	4.3 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.4

Murine macrophages ( $5 \times 10^5$  cells) were infected with stationary promastigotes of *L. amazonensis* ( $1 \times 10^6$  and  $5 \times 10^6$ , by a ratio of 1:2 or 1:10 macrophage per parasites, respectively) and the cultures were incubated for 24 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Next, free parasites were removed and the percentage of infected cells and the number of amastigotes per macrophage in each passage (R0, R10, R20, and R30) were analyzed by counting 200 cells in triplicate. Mean  $\pm$  SD is shown. Data shown are representative of three separate experiments, performed in triplicate, which presented similar results.  
doi:10.1371/journal.pntd.0002764.t001



**Figure 2. Two-dimensional profiles of cultures from *Leishmania amazonensis*.** The 2-DE gels were obtained after the separation of stationary promastigotes extracts (R0, R10, R20, and R30 passages; 650  $\mu$ g of each extract) by 2-DE (first dimension: IEF pH range 4–7; second dimension: 12% SDS-PAGE) and staining with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250. The gel fragments in the lower portion of the figures represent evaluated amplifications (see within the dotted lines). 2-DE gels of each passage were derived from four independent protein preparations of each passage. One representative preparation of each sample is showed in this study. doi:10.1371/journal.pntd.0002764.g002

experiments (Figure 3). When promastigote extracts were employed, the selected proteins showed a variation that runs in line with the results obtained in the 2-DE gels. In addition, the decrease in the level of  $\alpha$ -tubulin and paraflagellar rod protein 1D detected in the promastigote forms are also maintained when the R30 forms are axenically derived into the amastigote stage of the parasite.

## Discussion

*Leishmania amazonensis* is a member of the *Leishmania mexicana* complex, and it is the etiological agent for a broad spectrum of disease in South American countries [5]. The mechanisms of *in vivo* persistence are of particular interest to this parasite species, given that several lines indicate that *L. amazonensis*, when compared to other *Leishmania* species, is particularly adept at surviving attacks from intracellular killing mechanisms [5,14]. Taking this into account, the present study applied a proteomic approach to analyze the variation of the protein expression profile from *L. amazonensis*, which was pre-isolated from lesions of chronically infected BALB/c mice and maintained in *in vitro* cultures over a long period of time. The purpose of this study was to verify whether or not the *in vitro* cultivation, performed over a 150-day period, could in fact decrease the parasites' infectivity, as well as to identify proteins that could present a relation with a possible loss of infectivity in *L. amazonensis*.

Studies have shown that the maintenance of *Leishmania* in axenic cultures over long periods of time constitutes a relevant factor in the reduction of infectivity in *L. infantum* [71] and *L. major* [72]. In one study, the loss of infectivity in *L. infantum* was related to the maintenance of the parasites after 105 days of successive *in vitro* passages [73]. Proteomic analyses have been employed successfully to identify proteins expressed in both promastigote and amastigote stages of *Leishmania spp.*, as well as to evaluate the stage-specific proteins and protein expression profile in the parasites

[8,11,74,75,76,77]. In the present study, proteins that presented a significant variation in their content, observed using 2-DE gels and analyzed by bioinformatics programs, were identified in an attempt to select possible targets for future immunological interventions in leishmaniasis. For this, stationary promastigotes were used in the same concentration in all passages so as to perform the experiments properly. In general, an increase of *Leishmania* promastigote infectivity can also be observed when parasites pass from the logarithmic phase (days 1–3) to the stationary phase (days 4–6) of their growth cycle in *in vitro* cultures [78,79,80,81]. In the present study, it could be observed that the percentage of the stationary promastigotes found in all cultures was homogeneous, suggesting that the changes found in the protein expression profile and in the infectivity values of the parasites submitted to axenic cultures, could not only be associated with or depend on the reduction in the number of infective promastigotes present in the *in vitro* cultures.

Another important aspect here was the reduction in the *in vitro* and *in vivo* infectivity observed from R0 to R30 samples. In the *in vitro* experiments performed using murine macrophages, in addition to a significant decrease found in the percentage of infected macrophages, a marked reduction in the number of intracellular amastigotes could be observed. Evaluating *in vitro* cultures performed up to 300 days after infection (R60), as compared to R30, no significant difference was found in the percentage of infected macrophages, and in the number of intramacrophage amastigotes (data not shown). In addition, when R0 and R30 cultures were used to infect BALB/c mice, it could be observed that animals infected with R0 developed a more progressive disease than did those infected with the R30 sample, confirming the results obtained from *in vitro* experiments, though no significant difference could be observed between R20 and R30 in the infectivity experiments. Furthermore, the present study's data are in accordance with Moreira et al. (2012), which showed that *L. infantum* promastigotes present a significant loss of their

**Table 2.** Identification of proteins that presented a significant decrease in their expression content.

Match ID <sup>a</sup>	Identification <sup>b</sup>	Normalized values <sup>h</sup>												
		Uniprot ID <sup>c</sup>	pI (pred/exp) <sup>d</sup>	Mr (pred/exp) <sup>e</sup>	N <sup>o</sup> match peptide <sup>f</sup>	Coverage (%) <sup>g</sup>	R0	R10	R20	R30	Fold <sup>i</sup>	One-way ANOVA (P value) <sup>j</sup>	Function <sup>k</sup>	Literature <sup>l</sup>
116	Hypothetical protein	E9AVJ0	4.65/5.63	12/55	4(1)	1	1.00	0.78	0.60	0.46	2.18	7,24E-04	Unknown	Unknown
141	Hypothetical protein	E9ANW9	4.90/4.84	15/18	2(2)	8	1.00	0.66	0.59	0.48	2.09	6,91E-03	Unknown	Unknown
142	Small myristoylated protein-3	E9APT0	4.51/4.70	15/13	6(4)	32	1.00	0.75	0.48	0.46	2.18	7,97E-07	Unknown	Infectivity [22]
169	Small GTP-binding protein Rab1	E9AYX8	5.36/5.54	19/22	12(8)	60	1.00	0.62	0.50	0.32	3.13	4,95E-03	Transport	Infectivity [23]
184	Peroxidoxin	E9AW04	6.27/6.90	20/26	2(2)	6	1.00	0.78	0.45	0.42	2.38	3,24E-03	Metabolism	Vaccine [24]
185	Tyrosinase Peroxidase I	Q4QF76	6.19/6.79	20/25	13(10)	21	1.00	0.75	0.56	0.48	2.09	3,08E-03	Metabolism	Infectivity [25]
260	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain,putative	E9AT73	5.44/6.77	28/45	6(4)	12	1.00	0.80	0.63	0.38	2.63	4,90E-03	Metabolism	Infectivity [26]
291	$\alpha$ -tubulin	E9AP62	5.33/5.45	31/61	24(22)	31	1.00	0.81	0.58	0.47	2.13	7,89E-06	Structural	Infectivity [27]
312	Aldehyde dehydrogenase	E9AXJ1	6.67/7.52	34/55	2(1)	11	1.00	0.62	0.43	0.43	2.33	2,24E-05	Metabolism	Metabolism [28]
336	Metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32	E9B493	5.26/5.51	36/57	19(8)	23	1.00	0.81	0.59	0.44	2.27	3,67E-06	Protein synthesis	Infectivity [29]
388	Parafagellar rod protein 1D	E9ALP7	5.34/5.36	44/69	12(7)	16	1.00	0.89	0.62	0.37	2.71	1,52E-04	Structural	Infectivity [30]
412	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8	E9AUD5	4.05/5.64	48/82	4(3)	4	1.00	0.44	0.37	0.27	3.70	4,87E-03	Protein synthesis	Metabolism [31]
615	Hypothetical protein	E9ASMO	6.61/7.09	27/147	1(1)	0	1.00	0.88	0.63	0.37	2.71	9,05E-03	Unknown	Unknown
640	Actin	P45520	5.85/5.40	34/42	4(2)	13	1.00	0.51	0.40	0.18	5.56	6,49E-03	Structural	Metabolism [32]
646	Heat shock 70 kDa protein	Q07437	4.88/6.05	39/45	13(11)	14	1.00	0.78	0.40	0.37	2.71	1,56E-03	Protein folding	Infectivity [33]
653	Eukaryotic initiation factor 4A	O62591	4.65/5.83	42/45	8(4)	13	1.00	0.99	0.85	0.38	2.63	9,39E-03	Protein synthesis	Vaccine [34]
656	Parafagellar rod protein 2C	E9AQV6	5.18/5.73	43/77	4(1)	5	1.00	0.66	0.37	0.43	2.71	1,57E-04	Structural	Infectivity [35]
697	Hypothetical protein	E9B489	5.27/5.36	25/36	1(1)	4	1.00	0.60	0.55	0.41	2.44	1,47E-03	Unknown	Unknown
776	Enolase	E9APW3	5.80/5.48	30/47	4(3)	13	1.00	0.58	0.45	0.36	2.78	9,87E-04	Metabolism	Infectivity [36]
69	Glutamine synthetase	E9AKR5	5.81/5.71	38/43	4(3)	12	1.00	0.82	0.50	0.47	2.13	2,29E-05	Metabolism	Vaccine [37]
76	Malic enzyme	E9AWR7	5.01/5.79	39/63	13(8)	18	1.00	0.81	0.32	0.27	3.70	2,85E-04	Metabolism	Vaccine [38]
77	Putative phosphatase 2C	E9B0G2	4.96/4.93	41/43	8(7)	20	1.00	0.51	0.38	0.33	3.03	1,22E-03	Cell signaling	Infectivity [39]
107	Elongation factor 2	E9ASD6	6.03/5.77	12/95	1(1)	1	1.00	0.53	0.58	0.48	2.08	5,56E-03	Protein synthesis	Vaccine [40]
125	Endoribonuclease L-PSP (pb5)	E9AW21	5.86/5.52	13/17	2(2)	9	1.00	0.72	0.45	0.40	2.50	1,98E-03	DNA binding protein	Therapeutic [41]
149	Ribonucleoprotein p18	E9AQ29	5.09/5.55	16/22	4(0)	15	1.00	0.55	0.44	0.50	2.27	2,12E-04	DNA binding protein	Metabolism [42]
210	Hypothetical protein	E9AXT3	5.64/5.64	23/31	13(9)	29	1.00	0.61	0.50	0.58	2.04	1,10E-04	Unknown	Unknown
211	Hypothetical protein	E9B549	4.37/9.90	23/23	5(5)	25	1.00	0.51	0.47	0.58	2.08	1,56E-03	Unknown	Unknown
235	Metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	E9B2A8	6.64/5.06	25/120	1(1)	1	1.00	0.64	0.47	0.55	2.22	1,43E-04	Protein synthesis	Infectivity [43]
239	$\beta$ -tubulin	E9AMJ8	4.61/5.95	25/47	20(15)	32	1.00	0.56	0.42	0.47	2.38	2,64E-05	Structural	Infectivity [44]

Table 2. Cont.

Match ID <sup>a</sup>	Identification <sup>b</sup>	Mascot search results										Normalized values <sup>h</sup>		
		Uniprot ID <sup>c</sup>	<i>pI</i> (pred/exp) <sup>d</sup>	<i>Mr</i> (pred/exp) <sup>e</sup>	N° match peptide <sup>f</sup>	Coverage (%) <sup>g</sup>	R0	R10	R20	R30	Fold <sup>i</sup>	One-way ANOVA ( <i>P</i> value) <sup>j</sup>	Function <sup>k</sup>	Literature <sup>l</sup>
262	Chain A, Open And Closed Structures Of The Udp-Glucose Pyrophosphorylase From <i>Leishmania Major</i>	Q4QDU3	4.92/5.84	28/56	2(1)	2	1.00	0.65	0.49	0.42	2.38	8,46E-03	Metabolism	Metabolism [45]
296	Peptidase m20/m25/m40 family-like protein	E9B1Y8	5.04/5.10	32/38	5(5)	15	1.00	0.71	0.49	0.45	2.04	5,10E-04	Protein synthesis	Metabolism [46]
308	S-adenosylmethionine synthetase	E9B1C6	5.12/5.42	34/44	9(5)	16	1.00	0.91	0.58	0.49	2.04	3,36E-03	Metabolism	Metabolism [47]
381	Protein disulfide isomerase	E9AUD1	5.06/5.04	42/53	12(7)	22	1.00	0.90	0.44	0.41	2.44	1,05E-03	Metabolism	Infectivity [48]
519	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	E9ATH0	5.14/5.21	35/39	7(5)	14	1.00	0.42	0.32	0.22	4.55	2,13E-10	Protein synthesis	Metabolism [49]
584	Basic transcription factor 3a	E9ATF9	4.00/9.44	13/12	1(1)	15	1.00	0.37	0.24	0.26	3.85	6,69E-04	Protein synthesis	Metabolism [50]
586	60S acidic ribosomal protein P2-2	Q06382	4.04/4.23	13/11	8(8)	52	1.00	0.35	0.34	0.26	3.85	2,51E-03	Protein synthesis	Infectivity [51]
606	Thiol-dependent reductase 1	E9B3K3	6.38/5.65	24/46	3(2)	12	1.00	0.38	0.27	0.22	4.55	1,71E-05	Unknown	Vaccine [52]

a) Spots match ID number obtained from ImageMaster Platinum;

b) Name of the identified protein;

c) Uniprot identification code;

d) Experimentally predicted and expected isoelectric point (*pI*);

e) Experimentally predicted and expected molecular weight (*Mr*, in kDa);

f) Number of identified peptides by MS;

g) Percentage of the protein sequence covered by identified peptides;

h) Normalized data from R0 represented by mean values of each condition divided by R30 value;

i) Fold represents the maximum spot intensity mean value of the conditions divided by the smallest value;

j) One-way ANOVA ( $P < 0.01$ ) obtained from spot analysis;

k) Biological functions according to NCBI, UniProt, and Gene Ontology databases;

l) Biological activity and/or immunological application described in other studies; [22] Tull et al., 2010; [23] Oliveira et al., 2006; [24] Dafalla et al., 2011; [25] Iyer et al., 2008; [26] Hunger-Glaser et al., 1999; [27] Werbovetz et al., 1999; [28] Feng et al., 2011; [29] Niemrowicz et al., 2007; [30] Hunger-Glaser et al., 1997; [31] Alcolea et al., 2009; [32] Bhaskar et al., 2012; [33] Khanna et al., 2012; [34] Berberich et al., 2003; [35] Moore et al., 1996; [36] Swenerton et al., 2011; [37] Hummadi et al., 2006; [38] Martins et al., 2006; [39] Burns et al., 1993; [40] Kushawaha et al., 2011; [41] Misra et al., 2005; [42] Bringaud et al., 1995; [43] Eggleston et al., 1999; [44] Mureev et al., 2007; [45] Steiner et al., 2007; [46] Martínez-Rodríguez et al., 2012; [47] Drummelsmith et al., 2004; [48] Achour et al., 2002; [49] Buda et al., 2013; [50] Alcolea et al., 2011; [51] Martín et al., 2009; [52] Silva et al., 2012. The proteins were identified through the data included in the NCBI database (dated June 2012) for *Leishmania spp.*  
doi:10.1371/journal.pntd.0002764.t002

**Table 3.** Identification of proteins that presented a significant increase in their expression content.

Match ID <sup>a</sup>	Identification <sup>b</sup>	Uniprot ID <sup>c</sup>	p (pred/exp) <sup>d</sup>	Mr (pred/exp) <sup>e</sup>	N <sup>o</sup> . match peptide <sup>f</sup>	Coverage (%) <sup>g</sup>	Normalized values <sup>h</sup>							Literature <sup>i</sup>
							R0	R10	R20	R30	Fold <sup>i</sup>	One-way ANOVA (P value) <sup>j</sup>	Function <sup>k</sup>	
8	Calreticulin	E9B259	4.52/4.51	50/45	3(3)	5	1.00	3.26	4.40	4.49	4.49	6.96E-03	Protein folding	Metabolism [53]
12	Isocitrate dehydrogenase	E9B494	5.44/5.51	40/47	16(6)	28	1.00	1.71	1.76	2.51	2.51	2.41E-03	Metabolism	Metabolism [54]
303	60S acidic ribosomal subunit protein	E8NHJ8	5.07/5.00	33/35	26(21)	45	1.00	3.15	4.72	4.75	4.75	9.76E-05	Protein synthesis	Diagnosis [55]
326	Mannose-1-phosphate guanyltransferase	E9AW11	5.67/5.29	36/42	10(7)	23	1.00	2.07	2.25	3.24	3.24	1.72E-04	Metabolism	Metabolism [56]
392	Nucleosome assembly protein	E9ARZ6	4.64/4.64	45/40	17(9)	25	1.00	2.17	2.49	2.61	2.61	1.78E-04	DNA binding protein	Metabolism [57]
420	ATPase beta subunit	E9AXJ6	5.02/5.14	49/56	60(51)	49	1.00	1.74	1.89	2.02	2.02	9.55E-04	Metabolism	Metabolism [58]
432	T-complex protein 1, theta subunit	E9AUC7	5.27/5.24	54/59	27(18)	49	1.00	1.54	2.05	3.35	3.35	3.65E-04	Protein folding	Metabolism [59]
458	Chain A, Protein Structure Of Usp From <i>L. Major</i> in Apo-Form	D3G6S4	5.36/5.34	63/69	4(4)	3	1.00	1.82	3.11	3.24	3.24	2.57E-03	Metabolism	Metabolism [60]
739	Hs1vu complex proteolytic subunit-like,hs1vu complex proteolytic subunit-like, threonine peptidase, Clan T(1), family T1B	E9AT11	5.24/6.09	22/25	4(1)	9	1.00	1.65	1.87	2.05	2.05	3.70E-04	Protein synthesis	Metabolism [61]
767	6-phosphogluconolactonase	E9AYQ1	5.50/5.22	26/29	2(2)	8	1.00	1.39	1.71	2.27	2.27	1.63E-03	Metabolism	Metabolism [62]
40	Heat shock protein 83; HSP 83	P27741	6.27/5.00	31/81	1(1)	1	1.00	1.88	2.92	2.93	2.93	3.76E-03	Protein folding	Diagnosis [63]
62	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	E9B0E2	5.77/5.40	26/31	6(5)	25	1.00	2.39	3.13	3.42	3.42	6.53E-05	Metabolism	Metabolism [64]
230	Short chain dehydrogenase	E9B602	6.57/6.31	25/28	3(1)	9	1.00	2.16	2.61	2.62	2.62	8.48E-04	Metabolism	Therapeutic [65]
279	Reiske iron-sulfur protein precursor	E9B632	5.57/6.02	29/34	9(7)	43	1.00	1.83	2.43	2.89	2.89	6.34E-06	Metabolism	Metabolism [66]
327	Vacuolar ATPase subunit-like protein	E9AKM1	4.93/4.85	36/42	13(5)	25	1.00	1.75	2.39	2.49	2.49	3.74E-03	Metabolism	Metabolism [67]
510	Cyclin 1	E9AMR1	5.99/5.67	31/36	3(1)	13	1.00	2.26	2.28	2.78	2.78	8.78E-03	Protein synthesis	Metabolism [68]
529	Protein transport protein Sec13	E9B2C5	5.69/5.51	34/37	2(1)	9	1.00	2.45	2.78	3.00	3.00	2.79E-03	Unknown	Metabolism [69]
676	Hypothetical protein	E9ATK7	4.98/4.91	98/119	33(22)	27	1.00	1.75	2.75	2.80	2.80	3.84E-03	Unknown	Unknown

**Table 3. Cont.**

Match ID <sup>a</sup>	Identification <sup>b</sup>	Uniprot ID <sup>c</sup>	pI (pred/exp) <sup>d</sup>	Mr (pred/exp) <sup>e</sup>	N <sup>o</sup> match peptide <sup>f</sup>	Coverage (%) <sup>g</sup>	Normalized values <sup>h</sup>					Function <sup>k</sup>	Literature <sup>l</sup>	
							R0	R10	R20	R30	Fold <sup>i</sup>			One-way ANOVA (P value) <sup>j</sup>
735	Glucose-regulated protein 78; GRP78	E9AZT9	5.15/5.18	67/72	27(22)	28	1.00	4.69	4.84	4.87	4.87	9.57E-05	Protein folding	Vaccine [70]

a) Spots match ID number obtained from ImageMaster Platinum;  
 b) Name of the identified protein;  
 c) Uniprot identification code;  
 d) Experimentally predicted and expected isoelectric point (pI);  
 e) Experimentally predicted and expected molecular weight (Mr, in kDa);  
 f) Number of identified peptides by MS;  
 g) Percentage of the protein sequence covered by identified peptides;  
 h) Normalized data from R0 represented by mean values of each condition divided by the smallest value;  
 i) Fold represents the maximum spot intensity mean value of the conditions divided by the smallest value;  
 j) One-way ANOVA (P<0.01) obtained from spot analysis;  
 k) Biological functions according to NCBI, UniProt, and Gene Ontology databases;  
 l) Biological activity and/or immunological application described in other studies: [53] Joshi et al., 1996; [54] Tielens et al., 2010; [55] Soto et al., 1996; [56] Lackovic et al., 2010; [57] Scher et al., 2012; [58] Sánchez-Cañete et al., 2009; [59] Peris et al., 1994; [60] Steiner et al., 2007; [61] Jaramillo et al., 2011; [62] Duclert-Savatier et al., 2009; [63] Celeste et al., 2004; [64] Liu et al., 2011; [65] Leblanc et al., 1998; [66] Priest et al., 1996; [67] Bakker-Grunwald, 1992; [68] Banerjee et al., 2006; [69] Casanova et al., 2008; [70] Jensen et al., 2001. The proteins were identified through the data included in the NCBI database (dated June 2012) for *Leishmania* spp. doi:10.1371/journal.pntd.0002764.t003

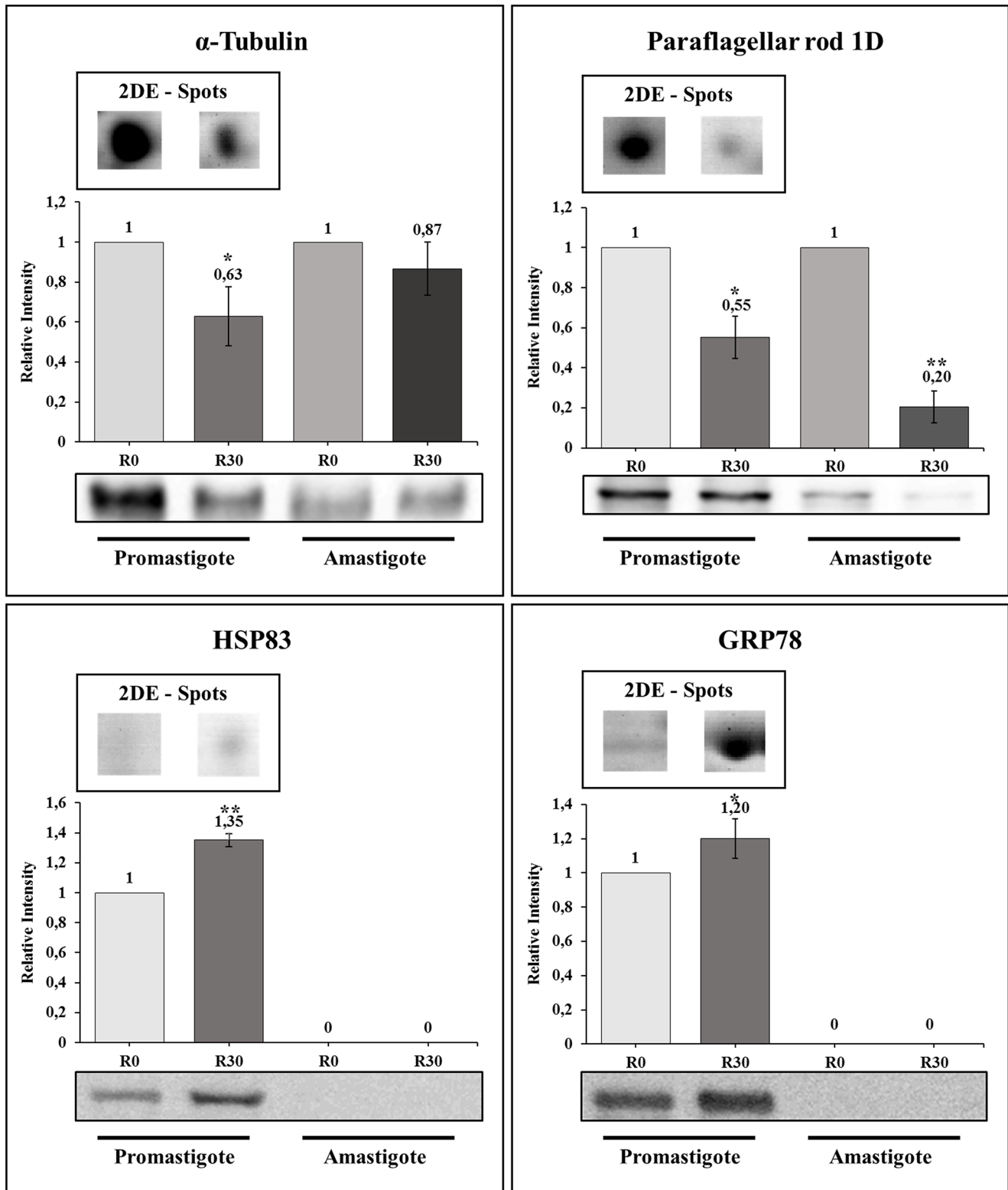
infectivity after 100 days of *in vitro* cultures, suggesting that this condition may well be related to specific modifications in the protein differentiation content of parasites [73].

In relation to the identified proteins that presented a decreased expression from R0 to R30, several had already been described in other published studies, such as proteins involved in the infectivity of *Leishmania* or in other parasite species. For example, peroxidoxin is a protein expressed in the endoplasmic reticulum of Trypanosomatids and is involved in cellular resistance to reactive oxygen species [82], been also a virulence factor described in *Trypanosoma cruzi* [83]. The malic enzyme is involved in the virulence of *Xanthomonas campestris* [84], while aldehyde dehydrogenase acts in the protection of mammal cells against damage evoked by osmotic and saline stress [85]. S-adenosylmethionine synthetase in *L. panamensis* [86] and *L. major* [87] is related to drug resistance. Enolase is a membrane protein that plays a role in the infectivity of *Leishmania*, as it is involved in the interaction between the parasites and host cells [88]. The carboxypeptidase family (M32) has also been identified as a virulence factor in *T. cruzi* [89] and operates in the catabolism of peptides, favoring the growth and multiplication of parasites [90]. Phosphatase 2C is considered a virulence factor in *Toxoplasma gondii* [91], while tryparedoxin peroxidase in *L. donovani* is involved in drug resistance [92].

Evaluating the databases of proteins that presented an increased expression from R0 to R30, most present metabolic functions described in prior literature, such as those related to cellular stress, recovery of improperly folded proteins, and the restoration of core functions. In this context, phosphatase 1 guanyltransferase mannose is involved in oxidative stress in yeast [93], while isocitrate dehydrogenase is involved in cellular stress in *Cryptococcus neoformans* [94]. The glucose regulated protein 78 kDa is a membrane protein that is up-regulated in conditions of cellular stress and that can lead to cell cycle arrest [95]. The protein complex Hs1VU-like proteolytic subunit is a peptidase that is over-expressed and correlated to the accumulation of improperly folded proteins within the cells [96]. Calreticulin is involved in cellular processes related to protein folding, calcium homeostasis, apoptosis, and cell differentiation [97].

Western blot assays with four identified proteins were performed to validate 2-DE gel quantification results. When promastigote samples were analyzed, a significant correlation could be observed when comparing the two techniques used for proteins with a decreased or increased expression in aged cultures (Figure 3). When axenic amastigote extracts were employed for Western blots, a decrease in the level of  $\alpha$ -tubulin and paraflagellar rod protein 1D observed in the 2-DE was also detected. Unfortunately, the lack of signs when antibodies against HSP83 and GRP78 were employed made it impossible to confirm whether or not the increase in protein expression associated with the loss of infectivity is maintained in the amastigote forms.

In conclusion, the data presented in the present study could contribute to a better understanding of the biological processes involved in a possible loss of infectivity of *L. amazonensis* when submitted to *in vitro* cultures over a long period of time, as described for other *Leishmania* species. Furthermore, the identified proteins presenting a significant decrease in their protein content during cultivation, including the hypothetical, should be evaluated in future studies, including vaccine candidates and/or immunotherapeutic targets against leishmaniasis. Additional studies are warranted in an attempt to address the major concern that identified proteins are indeed involved in the possible loss of virulence in the parasites cultured over long periods of time.



**Figure 3. Immunoblotting validation of some proteins in *Leishmania amazonensis*.** Representative immunoblotting of some proteins that presented a significant decrease or increase in their expression content between R0 and R30 passages, using promastigote and amastigotes-like forms of *L. amazonensis*, are shown here. For each protein [ $\alpha$ -tubulin, in A; paraflagellar rod protein 1D, in B; glucose-regulated protein 78 (GRP78) in C, and heat shock protein 83 (HSP83), in D], this image presents one example of correspondent 2-DE spot of promastigote form obtained from R0 or R30 passages. The antibodies used to validate each spot are described in the material and methods section. Asterisks represent the comparison between the expression of the protein in the R0 condition in relation to the R30 sample in each parasite stage, applying the Student's t-test ( $P < 0.05$ ), and the numbers represent the relative variation of each protein in comparison to R0 of each parasite stage. All experiments were performed in triplicate.

doi:10.1371/journal.pntd.0002764.g003



## Acknowledgments

The authors would like to thank to the Mass Spectrometry Laboratory of the Brazilian Biosciences National Laboratory to the Mass Spectrometry Laboratory (LNBio, CNPEM/ABTLuS, Campinas, Brazil) for its support in the mass spectrometry experiments, as well as to Dra Daniela Castanheira Bartholomeu (Department of Parasitology, UFMG), for providing the antibodies employed in the immunoblotting experiments.

## References

- World Health Organization (2010) Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Available: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf). 2010 Accessed 15 June 2013.
- Garcez LM, Goto H, Ramos PK, Brigido MC, Gomes PAF, et al. (2002) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-induced cutaneous leishmaniasis in the primate *Cebus apella*: a model for vaccine trials. *Int J Parasitol* 32: 1755–1764.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Momen H, Mc Mahon-Pratt D, Jesus AR, et al. (1991). Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44: 536–546.
- Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SMN, Cardoso FO, Souza CSF, et al. (2004) Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 121: 179–187.
- Grimaldi JrG, Tesh RB (1993) Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6: 230–250.
- Mitchell GF, Handman E, Spithill TW (1984) Vaccination against cutaneous leishmaniasis in mice using nonpathogenic cloned promastigotes of *Leishmania major* and importance of route of injection. *Aust J Exp Biol Med Sci* 62: 145–153.
- Hadighi R, Mohebbi M, Boucher P, Hajjarian H, Khamesipour A, et al. (2006) Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Med* 3: e162.
- Coelho VTS, Oliveira JS, Valadares DG, Duarte MC, Chávez-Fumagalli MA, et al. (2012) Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1430.
- Drummlersmith J, Brochu V, Girard I, Messier N, Ouellette M (2003) Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics* 2: 146–155.
- Chenik M, Lakkhal S, Ben Khalef N, Zribi L, Louzir H, et al. (2006) Approaches for the identification of potential excreted/secreted proteins of *Leishmania major* parasites. *Parasitology* 132: 493–509.
- Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, Mc Master WR (2007) Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* 152: 35–46.
- Morales MA, Watanabe R, Laurent C, Lenormand P, Rousselle JC, et al. (2008) Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. *Proteomics* 8: 350–363.
- Rosenzweig D, Smith D, Myler PJ, Olafson RW, Zilberstein D (2008) Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics* 8: 1843–1850.
- Paape D, Barrios-Lerena ME, Le Bihan T, Mackay L, Aebischer T (2010) Gel free analysis of the proteome of intracellular *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 169: 108–114.
- Costa CHN, Peters NC, Maruyama SR, Brito JrEC, Santos IKFM (2011) Vaccines for the leishmaniasis: Proposals for a research agenda. The working group on research priorities for development of leishmaniasis vaccines. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e943.
- Doyle PS, Engel JC, Pimenta PFP, Silva PP, Dwyer DM (1991) *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37°C. *Exp Parasitol* 73: 326–334.
- Coelho EA, Tavares CA, Carvalho FA, Chaves KF, Teixeira KN, et al. (2003) Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun* 71: 3988–3994.
- Valadares DG, Duarte MC, Oliveira JS, Martins VT, Costa LE, et al. (2011) Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. *Parasitol Int* 60: 357–363.
- Lewis TS, Hunt JB, Aveline LD, Jonscher KR, Louie DF, et al. (2000) Identification of novel MAP kinase pathway signalling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Mol Cell* 6: 1343–1354.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255–262.
- Tull D, Naderer T, Spurck T, Mertens HD, Heng J, et al. (2010) Membrane protein SMP-1 is required for normal flagellum function in *Leishmania*. *J Cell Sci* 123: 544–554.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EAFC CAPT MS RDMM MACF RAPN. Performed the experiments: RDMM MCD ECM VTM PSL DPL DMS. Analyzed the data: EAFC CAPT MS RDMM MACF. Contributed reagents/materials/analysis tools: MJMA WCBR. Wrote the paper: EAFC CAPT RDMM MS.

- Oliveira AH, Ruiz JC, Cruz AK, Greene LJ, Rosa JC, et al. (2006) Subproteomic analysis of soluble proteins of the microsomal fraction from two *Leishmania* species. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 1: 300–308.
- Daifalla NS, Bayih AG, Gedamu L (2011) Immunogenicity of *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase B1 and peroxidoxin 4 in BALB/c mice: the contribution of toll-like receptor agonists as adjuvant. *Exp Parasitol* 129: 292–298.
- Iyer J P, Kaprakkaden A, Choudhary ML, Shaha C (2008) Crucial role of cytosolic trypanedoxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Mol Microbiol* 68: 372–391.
- Hunger-Glaser I, Brun R, Linder M Seebeck T (1999) Inhibition of succinyl CoA synthetase histidine-phosphorylation in *Trypanosoma brucei* by an inhibitor of bacterial two-component systems. *Mol Biochem Parasitol* 100: 53–59.
- Werbovetz KA, Brendle JJ, Sackett DL (1999) Purification, characterization, and drug susceptibility of tubulin from *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 98: 53–65.
- Feng X, Feistel T, Buffalo C, Mc Cormack A, Kruvand E, et al. (2011) Remodeling of protein and mRNA expression in *Leishmania mexicana* induced by deletion of glucose transporter genes. *Mol Biochem Parasitol* 175: 39–48.
- Niemirowicz G, Parussini F, Agüero F, Cazzulo JJ (2007) Two metallo carboxypeptidases from the protozoan *Trypanosoma cruzi* belong to the M32 family, found so far only in prokaryotes. *Biochem J* 401: 399–410.
- Hunger-Glaser I, Seebeck T (1997) Deletion of the genes for the paraflagellar rod protein PFR-A in *Trypanosoma brucei* is probably lethal. *Mol Biochem Parasitol* 90: 347–351.
- Alcolea PJ, Alonso A, Sánchez-Gorostiaga A, Moreno-Paz M, Gómez MJ, et al. (2009) Genome-wide analysis reveals increased levels of transcripts related with infectivity in peanut lectin non-agglutinated promastigotes of *Leishmania infantum*. *Genomics* 93: 551–564.
- Bhaskar, Kumari N, Goyal N (2012) Cloning, characterization and sub-cellular localization of gamma subunit of T-complex protein-1 (chaperonin) from *Leishmania donovani*. *Biochem Biophys Res Commun* 429: 70–74.
- Khanra S, Datta S, Mondal D, Saha P, Bandopadhyay SK, et al. (2012) RFLPs of ITS, ITS1 and hsp70 amplicons and sequencing of ITS1 of recent clinical isolates of Kala-azar from India and Bangladesh confirms the association of *Leishmania tropica* with the disease. *Acta Trop* 124: 229–234.
- Berberich C, Ramirez-Pineda JR, Hambrecht C, Alber G, Skeiky YA, et al. (2003) Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol* 170: 3171–3179.
- Moore LL, Santrich C, LeBowitz JH (1996) Stage-specific expression of the *Leishmania mexicana* paraflagellar rod protein PFR-2. *Mol Biochem Parasitol* 80: 125–135.
- Swenerton RK, Zhang S, Sajid M, Medzihradsky KF, Craik CS, et al. (2011) The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem* 286: 429–440.
- Hummadi YM, Al-Bashir NM, Najim RA (2006) *Leishmania major* and *Leishmania tropica*. II. Effect of an immunomodulator, S(2) complex on the enzymes of the parasites. *Exp Parasitol* 112: 85–91.
- Martins DRA, Jeronimo SMB, Donelson JE, Wilson ME (2006) *Leishmania chagasi* T-cell antigens identified through a double library screen. *Infect Immun* 74: 6940–6948.
- Burns JMJr, Parsons M, Rosman DE, Reed SG (1993) Molecular cloning and characterization of a 42 kDa protein phosphatase of *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem* 268: 17155–17161.
- Kushawaha PK, Gupta R, Sundar S, Sahasrabudhe AA, Dube A (2011) Elongation factor-2, a Th1 stimulatory protein of *Leishmania donovani*, generates strong IFN- $\gamma$  and IL-12 response in cured *Leishmania*-infected patients/hamsters and protects hamsters against *Leishmania* challenge. *J Immunol* 187: 6417–6427.
- Misra S, Bennett J, Friew YN, Abdulghani J, Irvin-Wilson CV, et al. (2005) A type II ribonuclease H from *Leishmania* mitochondria: an enzyme essential for the growth of the parasite. *Mol and Biochem Parasitol* 143: 135–145.
- Bringaud F, Peris M, Zen KH, Simpson L (1995) Characterization of two nuclear-encoded protein components of mitochondrial ribonucleoprotein complexes from *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* 71: 65–79.
- Eggleston KK, Duffin KL, Goldberg DE (1999) Identification and characterization of falcylisin, a metallopeptidase involved in hemoglobin catabolism within the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 274: 32411–32417.
- Mureev S, Kushnir S, Kolesnikov AA, Breiting R, Alexandrov K (2007) Construction and analysis of *Leishmania tarentolae* transgenic strains free of selection markers. *Mol Biochem Parasitol* 155: 71–83.

45. Steiner T, Lamerz AC, Hess P, Breithaupt C, Krapp S, et al. (2007) Open and closed structures of the UDP-glucose pyrophosphorylase from *Leishmania major*. *J Biol Chem* 282: 13003–13010.
46. Martínez-Rodríguez S, García-Pino A, Heras-Vázquez FJ, Clemente-Jiménez JM, Rodríguez-Vico F, et al. (2012) Mutational and structural analysis of L-N-carbamoylase reveals new insights into a peptidase M20/M25/M40 family member. *J Bacteriol* 194: 5759–5768.
47. Drummel-Smith J, Girard I, Trudel N, Ouellette M (2004) Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *J Biol Chem* 279: 33273–33280.
48. Achour YB, Chenik M, Louzir H, Dellagi K (2002) Identification of a disulfide isomerase protein of *Leishmania major* as a putative virulence factor. *Infect Immun* 70: 3576–3585.
49. Buda P, Reinbothe T, Nagaraj V, Mahdi T, Luan C, et al. (2013) Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit e controls intracellular calcium homeostasis by regulation of cav1.2 surface expression. *PLoS One* 8: e64462.
50. Alcolea PJ, Alonso A, Larraga V (2011) Genome-wide gene expression profile induced by exposure to cadmium acetate in *Leishmania infantum* promastigotes. *Int Microbiol* 14: 1–11.
51. Martín OA, Villegas ME, Aguilar CF (2009) Three-dimensional studies of pathogenic peptides from the c-terminal of *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins and their interaction with a monoclonal antibody structural model. *PMC Biophys* 2: 4.
52. Silva AM, Tavares J, Silvestre R, Ouassi A, Coombs GH, et al. (2012) Characterization of *Leishmania infantum* thiol-dependent reductase 1 and evaluation of its potential to induce immune protection. *Parasite Immunol* 34: 345–350.
53. Joshi M, Pogue GP, Duncan RC, Lee NS, Singh NK, et al. (1996) Isolation and characterization of *Leishmania donovani* calreticulin gene and its conservation of the RNA binding activity. *Mol Biochem Parasitol* 81: 53–64.
54. Tielens AG, Van Grinsven KW, Henze K, Van Hellemond JJ, Martin W (2010) Acetate formation in the energy metabolism of parasitic helminths and protists. *Int J Parasitol* 40: 387–397.
55. Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C (1996) Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 387–391.
56. Lackovic K, Parisot JP, Sleebis N, Baell JB, Debien L, et al. (2010) Inhibitors of *Leishmania* GDP-mannose pyrophosphorylase identified by high-throughput screening of small-molecule chemical library. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1712–1719.
57. Scher R, Garcia JB, Pascoalino B, Schenkman S, Cruz AK (2012) Characterization of anti-silencing factor 1 in *Leishmania major*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 377–386.
58. Sánchez-Cañete MP, Carvalho L, Pérez-Victoria FJ, Gamarro F, Castans S (2009) Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 1305–1313.
59. Peris M, Frech GC, Simpson AM, Bringaud F, Byrne E, et al. (1994) Characterization of two classes of ribonucleoprotein complexes possibly involved in RNA editing from *Leishmania tarentolae* mitochondria. *EMBO J* 13: 1664–1672.
60. Steiner T, Lamerz AC, Hess P, Breithaupt C, Krapp S, et al. (2007) Open and Closed Structures of the UDP-glucose Pyrophosphorylase from *Leishmania major*. *J Biol Chem* 282: 13003–13010.
61. Jaramillo M, Gomez MA, Larsson O, Shio MT, Topisirovic I, et al. (2011) *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell Host Microbe* 9: 331–341.
62. Duclert-Savatie N, Poggi L, Miclet E, Lopes P, Ouazzani J, et al. (2009) Insights into the enzymatic mechanism of 6-phosphogluconolactonase from *Trypanosoma brucei* using structural data and molecular dynamics simulation. *J Mol Biol* 388: 1009–1021.
63. Celeste BJ, Angel SO, Castro LGM, Gidlund M, Goto H (2004) *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 37: 1591–1593.
64. Liu Y, Koh CMJ, Sun L, Ji L (2011) Tartronate semialdehyde reductase defines a novel rate-limiting step in assimilation and bioconversion of glycerol in *Ustilago maydis*. *PLoS One* 6: e16438.
65. Leblanc E, Papadopoulou B, Bernatchez C, Ouellette M (1998) Residues involved in co-factor and substrate binding of the short-chain dehydrogenase/reductase PTR1 producing methotrexate resistance in *Leishmania*. *Eur J Biochem* 251: 768–774.
66. Priest JW, Hajduk SL (1996) *In vitro* import of the rieske iron-sulfur protein by trypanosome mitochondria. *J Biol Chem* 271: 20060–20069.
67. Bakker-Grunwald T (1992) Ion transport in parasitic protozoa. *J Exp Biol* 172: 311–322.
68. Banerjee S, Sen A, Das P, Saha P (2006) *Leishmania donovani* cyclin 1 (LdCyc1) forms a complex with cell cycle kinase subunit CRK3 (LdCRK3) and is possibly involved in S-phase-related activities. *FEMS Microbiol Lett* 256: 75–82.
69. Casanova M, Portalès P, Blaineau C, Crobu L, Bastien P, et al. (2008) Inhibition of active nuclear transport is an intrinsic trigger of programmed cell death in trypanosomatids. *Cell Death Differ* 15: 1910–1920.
70. Jensen AT, Curtis J, Montgomery J, Handman E, Theander TG (2001) Molecular and immunological characterisation of the glucose regulated protein 78 of *Leishmania donovani*. *Biochim Biophys Acta* 1549: 73–87.
71. Grimm F, Brun R, Jenni L (1991) Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. *Parasitol Res* 77: 185–191.
72. Segovia M, Artero JM, Mellado E, Chance ML (1992) Effects of long-term in vitro cultivation on the virulence of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. *Ann Trop Med Parasitol* 86: 347–354.
73. Moreira D, Santarém N, Loureiro I, Tavares J, Silva AM, et al. (2012) Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1469.
74. Pawar H, Sahasrabudhe NA, Renuse S, Keerthikumar S, Sharma J, et al. (2012) A proteogenomic approach to map the proteome of an unsequenced pathogen - *Leishmania donovani*. *Proteomics* 12: 832–844.
75. Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, et al. (2003) Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 3: 1811–1829.
76. Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero J, Smith DF (2004) Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 136: 51–62.
77. Mc Nicoll F, Drummel-Smith J, Muller M, Madore E, Boillard N, et al. (2006) A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics* 6: 3567–3581.
78. Walker J, Vasquez JJ, Gomez MA, Drummel-Smith J, Burchmore R, et al. (2006) Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigote and axenic amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 147: 64–73.
79. Sacks DL, Perkins PV (1984) Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223: 1417–1419.
80. Da Silva R, Sacks DL (1987) Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun* 55: 2802–2806.
81. Bates PA (1994) Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology* 8: 1–9.
82. Demasi APD, Martinez EF, Napimoga MH, Freitas LL, Vassallo J, et al. (2013) Expression of peroxiredoxins I and IV in multiple myeloma: association with immunoglobulin accumulation. *Virchows Arch* 463: 47–55.
83. Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Martinez A, Radi R (2012) *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas' disease. *Antioxid Redox Signal* 19: 723–734.
84. Tang D-J, He Y-Q, Feng J-X, He B-R, Jiang B-L, et al. (2005) *Xanthomonas campestris* possesses a single gluconeogenic pathway that is required for virulence. *J Bacteriol* 187: 6231–6237.
85. Brocker C, Lassen N, Estey T, Pappa A, Cantore M, et al. (2010) Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *J Biol Chem* 285: 18452–18463.
86. Walker J, Gongora R, Vasquez J, Drummel-Smith J, Burchmore R, et al. (2012) Discovery of factors linked to antimony resistance in *Leishmania panamensis* through differential proteome analysis. *Mol Biochem Parasitol* 183: 166–176.
87. Drummel-Smith J, Girard I, Trudel N, Ouellette M (2004) Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *J Biol Chem* 279: 33273–33280.
88. Ghosh AK, Jacobs-Lorena M (2011) Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 85–90.
89. Alvarez VE, Niemirowicz GT, Cazzulo JJ (2012) The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* 1824: 195–206.
90. Isaza CE, Zhong X, Rosas LE, White JD, Chen RP-Y, et al. (2008) A proposed role for *Leishmania major* carboxypeptidase in peptide catabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 25–29.
91. Jan G, Delorme V, Saksouk N, Abrivard M, Gonzalez V, et al. (2009) A *Toxoplasma* type 2C serine-threonine phosphatase is involved in parasite growth in the mammalian host cell. *Microbes Infect* 11: 935–945.
92. Iyer JP, Kaprakkaden A, Choudhary ML, Shaha C (2008) Crucial role of cytosolic trypanoxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Mol Microbiol* 68: 372–391.
93. Suslu KG, Palabiyik B, Temizkan G (2011) Genes involved in glucose repression and oxidative stress response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genet Mol Res* 10: 4041–4047.
94. Brown SM, Upadhyay R, Shoemaker JD, Lodge JK (2010) Isocitrate dehydrogenase is important for nitrosative stress resistance in *Cryptococcus neoformans*, but oxidative stress resistance is not dependent on glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Eukaryot Cell* 9: 971–980.
95. Poblete-Castro I, Binger D, Rodrigues A, Becker J, Martins-dos-Santos VAP, et al. (2013) In-silico-driven metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for enhanced production of poly-hydroxyalkanoates. *Metab Eng* 15: 113–123.
96. Yoo SJ, Seol JH, Kang MS, Chung CH (1996) Poly-L-lysine activates both peptide and ATP hydrolysis by the ATP-dependent HsVU protease in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 531–535.
97. Ramirez G, Valck C, Aguilar L, Kemmerling U, López-Muñoz R, et al. (2012) Roles of *Trypanosoma cruzi* calreticulin in parasite-host interactions and in tumor growth. *Mol Immunol* 52: 133–140.