



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



Bárbara Beiral Esteves Santana

PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE ABUNDANTES ENTRE
ISOLADOS DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS*
CARACTERIZADOS COMO AGENTES DE LESÕES ATÍPICAS E TÍPICAS

Belo Horizonte

2023

Bárbara Beiral Esteves Santana

**PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE ABUNDANTES ENTRE
ISOLADOS DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS*
CARACTERIZADOS COMO AGENTES DE LESÕES ATÍPICAS E TÍPICAS**

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

Orientadora: Dra. Héliida Monteiro de Andrade

Coorientadora: Dra. Marcella Nunes de Melo Braga

Área de concentração: Protozoologia

Belo Horizonte

2023

043

Santana, Bárbara Beiral Esteves.

Proteínas diferencialmente abundantes entre isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* caracterizados como agentes de lesões atípicas e típicas [manuscrito] / Bárbara Beiral Esteves Santana. – 2023.

122 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Héli da Monteiro de Andrade. Coorientadora: Dra. Marcella Nunes de Melo Braga.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Leishmaniose Cutânea. 3. Proteômica. 4. Antimônio. I. Andrade, Héli da Monteiro de. II. Braga, Marcella Nunes de Melo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

TESE 343/2023/06

TÍTULO DA TESE: "PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE ABUNDANTES ENTRE ISOLADOS DE LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS CARACTERIZADOS COMO AGENTES DE LESÕES ATÍPICAS E TÍPICAS"

ALUNO: BÁRBARA BEIRAL ESTEVES SANTANA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROTOZOOLOGIA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **três de maio de 2023**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

Jerônimo Conceição Ruiz

Membro externo - IRR/FIOCRUZ

Willian de Castro Borges

Membro externo - UFOP

Daniella Castanheira Bartholomeu

Membro interno - UFMG

Thiago de Castro Gomes

Membro interno - UFMG

Marcella Nunes Melo Braga

Coorientadora - UFMG

Hélida Monteiro de Andrade

Orientadora - UFMG

Belo Horizonte, 03 de maio de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Coordenador(a)**, em 04/05/2023, às 13:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Castanheira Bartholomeu, Professora do Magistério Superior**, em 05/05/2023, às 09:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago de Castro Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 05/05/2023, às 10:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcella Nunes de Melo Braga, Usuário Externo**, em 06/05/2023, às 06:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jeronimo Conceição Ruiz, Usuário Externo**, em 07/05/2023, às 08:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **William de Castro Borges, Usuário Externo**, em 16/05/2023, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2258475 e o código CRC B85A7A52.

*Este trabalho é dedicado ao meu marido Luan e à minha filha
por nascer, Maria Júlia. Vocês são meu maior tesouro.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus, pelo dom da vida renovado a cada manhã, pela sua presença constante em todos os momentos, e pela verdadeira paz que me sustentou durante as dificuldades.

À Dra. Héliida M. Andrade, pela oportunidade de realizar este trabalho e por sua orientação impecável, sempre compartilhando ensinamentos valiosos. Além disso, agradeço especialmente pela amizade construída ao longo deste processo e pelo exemplo inspirador de ética e profissionalismo que sempre demonstrou.

À Dra. Marcella N. de Melo Braga por sua co-orientação imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho. Sua ajuda e conselhos assertivos nos momentos de dúvidas foram indispensáveis para a conclusão deste projeto.

À Dra. Patrícia Quaresma, pela colaboração nos cedendo as valiosas amostras biológicas.

Ao Dr. Martin R. Larsen e Dr. Vladimir Gorshkov pela colaboração nos ensaios de LC-MS/MS e por nos abrirem as portas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da SDU na Dinamarca.

Aos colegas do Laboratório de Leishmanioses e agregados pela convivência amigável: Amanda, Anna, Bruninha, Dri, Elaine e Thábata.

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

Aos meus pais pelo amor incondicional que sempre me dedicaram, pelas mãos estendidas durante as dificuldades, pela torcida constante pela minha felicidade e sucesso, além do enorme apoio que sempre me deram.

Ao Luan, meu marido, companheiro de todas as horas, amor e amigo, pela paciência, pelo incentivo e compreensão. Sua companhia faz os meus dias mais leves.

Aos amigos que se fazem presentes, vocês me ajudam a crescer um pouco a cada dia.

Ao programa de Pós-graduação em Parasitologia.

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

Às secretárias Sumara e Sibebe, pela disposição em nos ajudar em tudo.

Aos colegas e funcionários do Departamento.

Às agências CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos que, de forma direta ou indireta, fizeram parte deste trabalho.

*“O temor do SENHOR é o princípio da sabedoria”.
Provérbios 9:10*

RESUMO

Leishmania (Viannia) braziliensis é o principal agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana (LTA), que apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, desde lesões ulceradas na pele até o acometimento das mucosas nasal e oral, conhecidas como leishmaniose mucosa ou mucocutânea. Além disso, essa espécie pode causar lesões atípicas como pápulas, lesões verrucosas e queloides, e placas crostosas e ulceradas. Casos de leishmaniose tegumentar atípica não ulcerada causada por *L. braziliensis* têm sido relatados em várias regiões do mundo, incluindo a reserva indígena Xacriabá em São João das Missões/Minas Gerais, Brasil. A *L. braziliensis* é caracterizada por variável infectividade, virulência e resposta terapêutica e não há consenso sobre os fatores envolvidos nos casos de manifestações clínicas atípicas. No presente estudo, proteínas que apresentam abundância diferencial em duas cepas de *L. braziliensis* isoladas de pacientes com lesões atípicas (LbLA) em comparação com quatro cepas isoladas de pacientes com lesões típicas (LbLT) foram identificadas usando uma abordagem de proteômica quantitativa baseada em marcação com “tags” de massa em tandem (TMT) e espectrometria de massa (MS). Foram encontradas 532 ($p < 0,05$) proteínas diferencialmente abundantes nas cepas de lesões atípicas em comparação com as cepas de lesões típicas. A análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO) mostrou que as proteínas com aumento de abundância estavam associadas às funções moleculares envolvendo a atividade oxidorrredutase e a processos biológicos como o processo biossintético de composto de nitrogênio celular e o processo metabólico peptídico. As proteínas com diminuição de abundância estavam associadas a atividades de proteína serina/treonina quinase e a processos biológicos como a via de fixação de carbono em procariontes e a degradação da valina, leucina e isoleucina. A regulação positiva de proteínas antioxidantes presentes na via da glutathione foi confirmada de forma indireta por meio do teste de atividade peroxidase uma vez que o consumo de peróxido de hidrogênio no grupo LbLA foi 3,01 vezes maior do que no grupo LbLT ($p < 0,001$). Além de proteínas associadas a maior atividade peroxidase (triparedoxina peroxidase e metionina sulfóxido redutase-like), as proteínas reguladas positivamente em cepas causadoras de lesões atípicas incluíram aquelas que podem conferir maior sobrevivência dentro de macrófagos (tripanotona redutase), proteínas que influenciam os estágios iniciais da infecção do hospedeiro mamífero (inibidores da serina protease -ISP) e proteínas relacionadas à resistência ao antimônio (triparedoxina peroxidase). Nossos achados contribuem para a caracterização dessas cepas intrigantes de *L. braziliensis* e fornecem uma nova perspectiva sobre casos de leishmaniose tegumentar atípica que têm sido associados a falhas terapêuticas.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar atípica, Proteômica, abundância, TMT, Resistência, antimônio.

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis is the main etiologic agent of American cutaneous leishmaniasis, which presents various of clinical manifestations, from typical skin lesions to involvement of the nasal and oral mucous, known as mucocutaneous leishmaniasis. In addition, this species can cause atypical lesions such as papules, verrucous and keloid lesions, and crusty and ulcerated plaques. Cases of non-ulcerated atypical cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis* have been reported in various regions of the world, including the Xacriaba indigenous reserve in São João das Missões/Minas Gerais, Brazil. *L. braziliensis* is characterized by variable infectivity, virulence, and therapeutic response, and there is no consensus on the factors involved in cases of atypical clinical manifestations. In the present study, proteins that show differential abundance in two strains of *L. braziliensis* isolated from patients with atypical lesions (LbAL) compared to four strains isolated from patients with typical lesions (LbTL) were identified using a quantitative proteomic approach based on tandem mass tag (TMT) labeling and mass spectrometry (MS). A total of 532 ($p < 0.05$) differentially abundant proteins were found in strains with atypical lesions compared to strains with typical lesions. Gene ontology (GO) enrichment analysis showed that the upregulated proteins were associated with molecular functions involving oxidoreductase activity and biological processes such as cellular nitrogen compound biosynthetic process and peptide metabolic process. Downregulated proteins were associated with serine/threonine protein kinase activities and biological processes such as carbon fixation in prokaryotes and valine, leucine, and isoleucine degradation. The positive regulation of antioxidant proteins present in the glutathione pathway was confirmed by the peroxidase activity test, since hydrogen peroxide consumption in the LbAL group was 3.01 times higher than in the LbTL group ($p < 0.001$). In addition to proteins associated with higher peroxidase activity (trypanothione peroxidase), methionine sulfoxide reductase-like) upregulated proteins in strains causing atypical lesions included those that may confer greater survival within macrophages (trypanothione reductase), proteins that influence the early stages of mammalian host infection (ISP), and proteins related to antimony resistance (trypanothione peroxidase). Our findings contribute to the characterization of these intriguing strains of *L. braziliensis* and provide a new perspective on cases of atypical cutaneous leishmaniasis that have been associated with therapeutic failures.

Keywords: atypical cutaneous leishmaniasis, proteome, abundance, TMT, antimony resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de lesões típicas (A) e atípicas (B–F) de pacientes com LTA.

Figura 2: Delineamento experimental.

Figura 3. Perfil cromatográfico de cada replicata técnica A. *Set 1.* B. *Set 2.* C. *Set 3.*

Figura 4: Identificação de proteínas em três replicatas experimentais.

Figura 5: Categorização de Ontologia Gênica (Gene Ontology – GO) das proteínas identificadas.

Figura 6: Abundância relativa de proteínas das cepas do grupo de lesões atípicas e típicas.

Figura 7: Análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO).

Figura 8: Predição de interação entre proteínas diferencialmente abundantes *em L. braziliensis* que fazem parte das categorias de GO enriquecidas.

Figura 9: Análise do enriquecimento de vias metabólicas por KEGG.

Figura 10: Predição de interação entre proteínas diferencialmente abundantes em *L.(V) braziliensis* que fazem parte de vias metabólicas enriquecidas.

Figura 11: Atividade peroxidase.

Figura 12. Cinética da atividade peroxidase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Delineamento experimental para marcação das amostras com TMT.

Tabela 2: Categorização funcional baseada na Ontologia Gênica (GO) das proteínas identificadas.

Tabela 3: Análise de enriquecimento de Ontologia Gênica (GO) de Função Molecular em proteínas diferencialmente abundantes em *L. braziliensis* causadoras de lesões atípicas (LbLA) em comparação com *L. braziliensis* causadoras de lesões típicas (LbLT).

Tabela 4: Análise de enriquecimento de Ontologia Gênica (GO) de Processo Biológico em proteínas reguladas diferencialmente em *L. braziliensis* causadoras de lesões atípicas (LbLA) em comparação com *L. braziliensis* causadoras de lesões típicas (LbLT).

Tabela 5: Análise de enriquecimento de Ontologia Gênica (GO) de Componente Celular em proteínas reguladas diferencialmente em *L. braziliensis* causadoras de lesões atípicas (LbLA) em comparação com *L. braziliensis* causadoras de lesões típicas (LbLT).

Tabela 6: Vias metabólicas por KEGG das proteínas reguladas diferencialmente em *L. braziliensis* causadoras de lesões atípicas (LbLA) em comparação com *L. braziliensis* causadoras de lesões típicas (LbLT).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN: acetonitrila

AmB: Anfotericina B

CEC: carcinoma espinocelular

CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propane sulfonate

DDA: data-dependent acquisition

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: ditioneitol

FDR: False Discovery Rate

FM: Função Molecular

GO: Ontologia Gênica

GSH: Glutathiona

HCD: dissociação de colisão de alta energia

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HPLC: cromatografia líquida de alto desempenho

hsp70: proteína de choque térmico de 70 kilodáltons

IAA: iodoacetamida

IL: Interleucina

INF- γ : Interferon - gama

iTRAQ: Isobaric tag for relative and absolute quantitation

LbLA: *Leishmania braziliensis* causadora de lesões atípicas

LbLT: *Leishmania braziliensis* causadora de lesões típicas

LC: Leishmaniose cutânea

LCD: Leishmaniose cutânea difusa

LM: Leishmaniose mucosa

LMC: Leishmaniose mucocutânea

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa in tandem

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

MLEE: Multilocus enzyme electrophoresis

m/z: massa/carga

MS/MS: espectrometria de massa in tandem

MS: espectrometria de massa

NNN: Novy–MacNeal–Nicolle medium

PB: Processo Biológico

PCR-RFLP: reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

PPI: Predição de interação entre proteínas

PSG: gel secretado por promastigotas

RNA: Ácido ribonucleico

SIL: *stable-isotope labeling*

SMF: Sistema Mononuclear Fagocitário

SRM: Selected reaction monitoring

TMT : Tandem mass tag

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TEAB: Triethylammonium bicarbonate

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	<i>Leishmania</i> e Leishmanioses	16
1.2	<i>Leishmania braziliensis</i> e Leishmaniose Tegumentar Atípica	22
1.3	Proteômica aplicada em <i>Leishmania</i> spp.	29
2	JUSTIFICATIVA	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Declaração de ética	39
4.2	Parasitas	39
4.3	Delineamento experimental	40
4.4	Proteômica	41
4.4.1.	Extração de proteínas e marcação com TMT	41
4.4.2	Pré-fracionamento dos peptídeos por Cromatografia Líquida em Fase Reversa em pH elevado	43
4.4.3	LC-MS/MS	44
4.4.4	Análise de Dados	44
4.4.5	Disponibilidade de Dados	46
4.5	Validação Funcional dos Dados Proteômicos	46
4.5.1	Atividade Peroxidase	46
5	RESULTADOS	46
5.1	Proteômica de <i>L. braziliensis</i>	46
5.2	Quantificação relativa de proteínas das cepas do grupo de lesões atípicas e típicas	53
5.3	Análise de enriquecimento Funcional	55
5.4	Predição de Interação Proteína-Proteína (PPI)	63
5.5	Análise de enriquecimento de vias metabólicas	64
5.6	Atividade de peroxidase	69
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÕES	81

REFERÊNCIAS	82
ANEXO	93
1. Artigo publicado.....	93
Tabela suplementar S1:	109
Tabela suplementar S2:	109
Tabela suplementar S3:	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* e Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), que são transmitidos a diversos mamíferos incluindo o homem, pela picada de flebotomíneos, principalmente dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Elas são consideradas doenças tropicais negligenciadas, afetando principalmente a população mais pobre do planeta, estando associada à desnutrição, deslocamento populacional, moradia precária e pessoas imunossuprimidas. São amplamente difundidas nas regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo endêmicas em 98 países e territórios distribuídos na Europa, África, Ásia e Américas (ALVAR et al., 2012). Mais recentemente segundo os relatórios disponibilizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018 havia 92 países ou territórios que foram considerados endêmicos ou já haviam relatado casos de uma das formas das Leishmanioses, sendo que atualmente mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para essas doenças e correm risco de serem infectadas. Anualmente, estima-se que ocorram mais de 1 milhão de novos casos de leishmanioses no mundo (WHO, 2023).

Cerca de 31 espécies de *Leishmania* estão distribuídas mundialmente e são conhecidas por parasitar grande diversidade de mamíferos, tais como roedores, canídeos, procionídeos, ungulados primitivos, marsupiais, edentados e primatas. Destas espécies, cerca de 20 são transmitidas ao homem (AKHOUNDI et al., 2016). As espécies se diferenciam por diversos aspectos, o que levou a subdivisão de subgêneros. O subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) inclui espécies que ocorrem principalmente no Velho Mundo e que tem por característica se desenvolverem no intestino médio anterior do inseto (desenvolvimento Suprapilaria). Em contrapartida o subgênero *Leishmania* (*Viannia*) reúne os parasitas que ocorrem principalmente no Novo Mundo e que apresentam desenvolvimento no intestino médio posterior do vetor (desenvolvimento peripilaria) (LAINSON & SHAW 1987). Recentemente, foi proposto um novo subgênero, *Leishmania* (*Mundinia*), que abriga espécies previamente classificadas no “complexo de *L. enriettii*”. Assim como nos primeiros subgêneros, *Leishmania* (*Mundinia*) inclui espécies

causadoras das leishmanioses em humanos e outros vertebrados (ESPINOSA et al., 2016).

Os vetores da leishmaniose são dípteros da família *Psychodidae*, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. Somente as fêmeas são hematófagas e realizam repastos sanguíneos por telmofagia. São dípteros de atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos. São encontrados em tocas de animais silvestres, buracos de pau, ocos de bambu. Aproximadamente 800 espécies de flebotomíneos foram descritas até o momento sendo aproximadamente 464 espécies encontradas no Novo Mundo e 375 no Velho Mundo (AKHOUNDI et al., 2016). Em apenas 30 espécies foram demonstradas evidências convincentes de capacidade vetorial (BATES, 2007).

O ciclo de transmissão da leishmaniose ocorre quando as fêmeas de flebotomíneo ao realizar o repasto sanguíneo em um animal infectado ingere formas amastigotas internalizadas por células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) presentes na massa formada pela sua picada telmofágica. No trato intestinal do inseto, as amastigotas envoltas pela matriz peritrófica se diferenciam em promastigotas que se ancoram via flagelo às microvilosidades do epitélio intestinal evitando a expulsão durante a liberação do bolo fecal. As promastigotas pró-cíclicas se convertem em promastigotas metacíclicas, a forma infectante, por um processo denominado metaciclogênese. Nesse processo a *Leishmania* passa por vários estágios não infecciosos sendo: promastigotas pró-cíclicas, nectomonas, leptomonas, haptomonas e, quando ocorrer uma alimentação sanguínea não infectante, as promastigotas metacíclicas podem se desdiferenciar gerando as formas retroleptomonadas (SERAFIM et al., 2018). Coletivamente, essas formas bloqueiam o intestino anterior do vetor modificando o seu comportamento alimentar. As promastigotas secretam o PSG (gel secretado por promastigotas), que faz com que o flebotomíneo regurgite os parasitos nos hospedeiros vertebrados durante a alimentação sanguínea (BATES, 2007). Nestes hospedeiros, as formas móveis são fagocitadas pelas células do SMF e internalizadas em vacúolos parasitóforos que tem por objetivo a destruição do parasito. Entretanto, mecanismos capazes de superar a ação microbicida

destas células favorecem a instalação da *Leishmania* no organismo do vertebrado e ela se diferencia na forma amastigota. Eventualmente, a carga parasitária aumenta, rompendo fisicamente os macrófagos infectados do hospedeiro e entregando as amastigotas extracelulares ao tecido circundante, onde são englobados por macrófagos não infectados. Os parasitos e macrófagos infectados podem disseminar na pele e órgãos viscerais (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014, BATES, 2007).

As características clínicas de uma infecção por *Leishmania* nos seres humanos incluem uma ampla gama de manifestações com diferentes graus de gravidade que dependem de diversos fatores como características do parasito, biologia do vetor e fatores do hospedeiro, com destaque para a resposta imune. As principais formas clínicas incluem a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT). Esta última se apresenta, principalmente, nas formas cutânea (LC), cutânea difusa (LCD) e mucocutânea (LMC), embora a infecção permaneça assintomática em muitos casos (ANDRADE-NARVAEZ et al., 2016).

A Leishmaniose visceral é a forma sistêmica mais grave que geralmente é fatal se não for tratada. A doença é causada por *L. donovani* na Ásia e na África e por *L. infantum* na Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Central, América do Sul e América Central. Apenas sete países, incluindo Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia e Brasil, concentram mais de 90% dos casos de Leishmaniose. No Brasil, a Leishmaniose é considerada uma doença emergente e reemergente, com ampla distribuição geográfica, devido a mudanças ambientais, migração humana e urbanização, conforme relatado por DESJEUX em 2001. O cão doméstico (*Canis familiaris*) é o principal reservatório da *L. infantum* e, portanto, a principal fonte de infecção para humanos em áreas urbanas, (GRAMICCIA & GRADONI, 2005). Esses animais sofrem com um alto nível de parasitismo cutâneo e visceral, o que aumenta a probabilidade de infecção dos vetores (REIS et al. 2006). A enzootia canina é frequentemente registrada antes dos casos humanos e a doença animal é mais prevalente do que a humana. (GAVGANI et al., 2002).

Clinicamente pode a leishmaniose visceral pode apresentar-se de forma assintomática (subclínica), aguda, subaguda ou crônica, após períodos de incubação bastante variáveis

(semanas a meses - DESJEUX, 1996). Nesta forma clínica, a proliferação de parasitos em macrófagos no fígado e baço dá origem a hepatoesplenomegalia progressiva e o parasitismo em macrófagos que se encontram na medula óssea leva a sua supressão. A supressão da medula óssea é uma condição em que a produção de células sanguíneas é reduzida ou interrompida neste órgão. Isso pode levar a uma pancitopenia resultando em anemia. Outros sinais clínicos incluem a febre irregular persistente e perda de peso. A menos que sejam tratados, os pacientes com LV acabarão sucumbindo à doença. (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014).

A forma tegumentar por outro lado, se manifesta pelo aparecimento de lesões únicas ou múltiplas ao longo da epiderme, afetando ou não as mucosas. Essa forma é causada por várias espécies como *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) tropica* no Velho Mundo e *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em várias regiões da América central e do Sul. A LC é a forma menos grave da doença e se apresenta como lesões ulcerativas ou nodulares singulares no local ou próximo ao local da picada do inseto. Estas lesões são geralmente encontradas em áreas descobertas do corpo, como rosto, antebraços e pernas, e evoluem ao longo de semanas a meses. Na forma cutânea difusa (LCD), lesões nodulares de tamanho variável surgem em vários locais frequentemente, distantes do local de exposição do inseto. A LCM se trata de lesões que ocorrem na mucosa do nariz, boca oro e nasofaringe e pálpebras podendo surgir devido à extensão ou metástase do parasito de uma doença cutânea local para o tecido mucocutâneo. Muitas vezes se trata de uma infecção terrivelmente desfigurante que pode afetar a função respiratória e dificultar a nutrição (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014).

A suspeita clínica de qualquer uma das formas de leishmaniose precisa ser confirmada uma vez que os sinais clínicos podem ser confundidos com outras doenças infecciosas. O diagnóstico clássico é através da observação microscópica do estágio amastigota do parasito em espécimes de tecidos ou culturas. Os aspirados esplênicos são considerados o padrão-ouro, para diagnóstico de LV, entretanto, o procedimento apresenta risco de hemorragia em um a cada 1.000 procedimentos (SUNDAR & RAI, 2002). Vários ensaios

sorológicos estão disponíveis, incluindo teste de aglutinação direta, ELISA, imunofluorescência e Western Blot. Essas técnicas de detecção de anticorpos compartilham uma alta sensibilidade para doença visceral aguda, mas não são estritamente específicas para esse estágio da doença. Portanto, os resultados sorológicos devem ser interpretados no contexto da história clínica. (BURZA et al., 2018). Em relação à forma tegumentar da doença atualmente, não existe um teste de referência único, mas a observação de amastigotas em uma amostra clínica estabelece o diagnóstico, seja por esfregaço direto de aspirado por agulha, esfregaço de pele, biópsia ou material cultivado (BURZA et al., 2018).

Os tratamentos atuais para as leishmanioses incluem quimioterapia com antimoniais e Anfotericina B (AmB). A AmB controla as infecções por *Leishmania* por meio da auto-oxidação do composto, levando à produção de radicais livres e ainda pela ligação às moléculas de ergosterol presentes na membrana dos parasitos, o que causa despolarização da membrana e subsequente influxo de íons culminando na morte do parasito (KUMARI et al., 2022). O mecanismo de ação do antimônio, por sua vez ainda não está claro. Entretanto, vários processos parecem estar envolvidos. Primeiramente acredita-se que a forma leishmanicida é o antimônio trivalente (SbIII), o que torna a bioconversão do SbV em SbIII pelo hospedeiro ou pelo parasito um evento chave de ativação. Uma das principais hipóteses do mecanismo de ação é que o antimônio interfere na via glicolítica do parasito, afetando drasticamente o metabolismo da glicose, a beta-oxidação de ácidos graxos e a formação de ATP (AÏT-LOUDHIA et al., 2011). Além disso, testes *in vitro* apontaram algumas proteínas como potenciais alvos tais como a topoisomerase e tripanotiona redutase que são proteínas necessárias para remover o estresse torsional do DNA e estresse oxidativo respectivamente. O composto SbIII diminui a capacidade intracelular de tamponamento de tiol de *Leishmania* promovendo a inibição da tripanotiona redutase (TR) e, assim, impedindo a síntese de tripanotiona um composto antioxidante encontrado em altas concentrações nos parasitos e que é necessário para manter o equilíbrio redox, protegendo-os dos danos causados pelos radicais livres (AÏT-LOUDHIA et al., 2011). No entanto, há limitações associadas ao uso desses medicamentos, tais como alto custo, toxicidade elevada, efeitos adversos, tempo prolongado de tratamento e resistência adquirida pelos parasitos. Essas limitações

podem levar os pacientes a desistir ou interromper o uso desses medicamentos, tornando necessário buscar novos compostos e abordagens para superar esses problemas.

A resistência aos medicamentos é o principal obstáculo para o esquema terapêutico atual. O antimônio tem sido utilizado a mais de 70 anos para o tratamento das leishmanioses e ao longo dos anos os parasitos parecem estar desenvolvendo mecanismos de resistência. Tais mecanismos incluem a prevenção da ativação de compostos, diminuição da absorção no parasito e aumento do efluxo de compostos devido ao papel da glicoproteína P e da proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas (MDR) na resistência a drogas. Além disso, os parasitos podem elevar a produção de tióis, que podem inativar as drogas antes que elas cheguem à TR. O tiol é produzido a partir de uma molécula precursora chamada Glutationa, que é encontrada em altas concentrações nas células dos parasitas. A molécula de tiol aumenta o estresse oxidativo dentro do macrófago impedindo a redução dos antimoniais pentavalentes à forma trivalente. Portanto, níveis aumentados de tiol intracelular estão associados com alta resistência antimonial (MOHAPATRA, 2014; TASLIMI et al., 2018). Encontrar soluções terapêuticas antileishmania adequadas tem sido um grande desafio para os sistemas de saúde no âmbito global.

Após a cura da infecção primária, indivíduos tornam-se resistentes às infecções futuras na maioria dos casos, o que sugere a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina contra a Leishmaniose. Estudos mostram que o uso de uma vacina seria mais vantajoso em termos de custo-benefício do que o desenvolvimento de novos medicamentos, mas atualmente não há nenhuma vacina global licenciada para uso em humanos (MOKNI 2019). O controle das leishmanioses, portanto, envolve medidas de prevenção e controle do vetor, o diagnóstico precoce, tratamento adequado dos casos diagnosticados bem como a redução do contato homem-vetor. O uso de inseticidas em domicílios e áreas peridomiciliares, redução de criadouros, eliminação de resíduos sólidos e vegetação em torno das casas, uso de repelentes e barreiras físicas, como telas em portas e janelas são algumas das principais medidas de controle recomendadas pela OMS. É importante ressaltar que as estratégias de controle devem ser específicas, conforme a situação epidemiológica de cada local.

1.2 *Leishmania braziliensis* e Leishmaniose Tegumentar Atípica

Leishmania (Viannia) braziliensis é uma importante espécie frequentemente associada à Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Esta espécie apresenta distribuição em vários países da América Central e do Sul, incluindo todo o território nacional sendo a espécie predominante nas regiões do Brasil onde a LTA é endêmica (BASANO & CAMARGO, 2004).

O ciclo de transmissão de *L. (V.) braziliensis* é zoonótico, envolvendo mamíferos silvestres em florestas virgens como descrito por Lainson et al., (1994). Pouco se sabe sobre seus hospedeiros silvestres, porém existem relatos de parasitos semelhantes em roedores dos gêneros *Akodon sp.*, *Proechimys sp.*, *Rattus sp.*, *Oryzomys sp.* e *Rhipidomys sp.* e no marsupial *Didelphis sp.* Alterações na ecoepidemiologia da LTA induzidas pelo ser humano nos últimos anos vem favorecendo o surgimento de novas situações epidemiológicas. Essas modificações levaram ao aparecimento de transmissão peridoméstica da *L. braziliensis*, com a invasão do peri e intradomicílio por espécies vetoras silvestres (GRIMALDI JR. & TESH, 1993). Além disso, a adaptação do principal vetor, *Lutzomyia intermedia*, aos ambientes peridomiciliar e domiciliar tem sido observada, assim como a presença de humanos, cães e outros animais infectados. Na transmissão peridoméstica, apresentam-se como hospedeiros: cavalos, cães, jumentos e até gatos (LAINSON, 2010). *L. braziliensis* é considerada a mais importante causadora de LTA no Brasil por ser a espécie mais frequentemente encontrada parasitando o homem e pela sua ampla distribuição no território brasileiro.

Uma das características de *L. braziliensis* é a sua capacidade de causar um amplo espectro de manifestações clínicas (LAINSON & SHAW, 1998). Lesões associadas a forma cutânea da leishmaniose tegumentar (LT) podem ser caracterizadas como pequenas pápulas e nódulos eritematosos (únicos ou múltiplos), geralmente localizados no local de inoculação do parasito. Com o tempo, essa lesão pode evoluir para úlceras regulares com bordas endurecidas e elevadas e fundos de granulação cruzada com ou sem exsudato seropurulento (MAGALHÃES et al., 1986; REITHINGER et al., 2007; ADRIANO et al., 2013; MEIRELES et al., 2017).

A *Leishmania braziliensis* causa ainda manifestações clínicas que caracterizam a leishmaniose mucosa (LM) ou Leishmaniose mucocutânea (LMC). A LM está associada a lesões capazes de destruir parcial ou totalmente as mucosas do nariz, boca e garganta, cavidades e tecidos circundantes. A razão pela qual os pacientes desenvolvem envolvimento da mucosa não é totalmente clara. Entretanto, atualmente é aceito que a leishmaniose clinicamente evidente depende de fatores que envolvem o parasito, resistência do hospedeiro e nível de resposta imunológica. A progressão da doença no homem, das lesões cutâneas para as do nariz, parece dar-se através do sistema linfático, vasos sanguíneos (metástases) e raramente por contato direto entre a mucosa e a lesão cutânea. A LM que tem por característica a latência e a cronicidade, é particularmente importante na América do Sul e é causada principalmente por *L. braziliensis*, embora *L. amazonensis* também tenha sido associada (COSTA et al., 1986, OLIVEIRA & BRODSKY 2012). Geralmente, 2-5% dos casos de LT nos quais a infecção primária (LC) cicatriza posteriormente desenvolvem LM (MARSDEN, 1990, LESSA et al., 2007), podendo ocorrer meses ou mesmo anos após a cura de uma LC. Entretanto o parasito pode ser encontrado na mucosa nasal sem evidências de lesão primária, ou em casos recentes de LC (RAMÍREZ & GUEVARA, 1997). Lesões provocadas pela *L. braziliensis* podem ser desfigurantes e, dependendo da gravidade e da área afetada, comprometem o trato digestivo e respiratório severamente. Além disso, elas podem acarretar problemas no âmbito social e psicológico em seus portadores devido a atitudes preconceituosas em relação às lesões.

Em relação ao genoma de *L. braziliensis*, O protozoário possui tem grande parte do seu material genético semelhante a outras espécies do mesmo gênero, mas apresenta cerca de 47 genes que são específicos desta espécie, o que indica uma certa divergência em relação às demais (PEACOCK et al., 2009). No entanto, apesar das semelhanças mencionadas, as espécies do subgênero *Leishmania Viannia* possuem diferentes formas de controlar a expressão gênica, e somente o *L. braziliensis* apresenta sinais de possuir a maquinaria de RNAi e elementos de DNA transponíveis (SMITH et al., 2008).

Outra característica relevante de *L. braziliensis* é a sua capacidade de causar formas distintas de leishmaniose tegumentar em humanos e animais (MEIRELES et al., 2017,

OLIVEIRA et al., 2013; BRILHANTE et al., 2019). Trata-se de leishmaniose tegumentar atípica que abrange casos em que as lesões provocadas têm aspectos incomuns e que não se enquadram em qualquer uma das formas clínicas bem caracterizadas da doença. Essas lesões apresentam alterações histológicas produzindo diferentes manifestações clínicas como pápulas, lesões verrucosas e queloides além de placas crostosas e ulceradas (BAPTISTA et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2009, QUARESMA et al., 2018 – Figura 1).



Figura 1: Exemplos de lesões típicas (A) e atípicas (B–F) de pacientes com LTA. (A) Lesões típicas: úlceras circulares ou ovais com eritematosa, infiltrada, firme, base avermelhada e granular e borda elevada bem delimitada. (B a F). Diferentes tipos de lesões atípicas: B – placa, C – pápulas, D – verrucosas, E – crostosas e F – placas ulceradas. Fonte: Quaresma et al. 2018.

Existem relatos de lesões atípicas de leishmaniose tegumentar em todo o mundo sendo provocada por várias espécies de *Leishmania* (MEIRELES et al., 2017). Os autores referiram-se às lesões atípicas como do tipo esporotricóide, erisipelóide, recidiva cutis ou zosteriforme (IFTIKHAR et al., 2003; KARINCAOGLU et al., 2004; CALVOPINA et al., 2005; OMIDIAN & MAPAR, 2006). Um grande impacto da ocorrência das lesões atípicas é o fato de que elas podem mimetizar muitas outras doenças. Essas lesões podem assemelhar-se a várias afecções da pele, tais como: blastomicose, esporotricose, diversas infecções fúngicas da pele, antraz cutâneo, eczema, hanseníase virchowiana, tuberculose, infecções por *Mycobacterium marinum*, carcinomas basocelulares e espinocelulares (CEC) e picadas de insetos (AKILOV et al., 2007, BARI & RAHMAN, 2008, CEYHAN et al., 2008, DASSONI et al., 2013, de BRITO et al., 2012). A semelhança

com essas doenças pode confundir os profissionais da saúde, resultando em atrasos no diagnóstico, submetendo os pacientes a tratamentos desnecessários, além de contribuir com a piora dos quadros clínicos (MEIRELES et al., 2017).

Iftikhar e colaboradores (2003) descreveram um caso de leishmaniose apresentando duas lesões atípicas raras (paroníquio e panarício) ocorrendo concomitantemente com lesões esporotricóides disseminadas. Neste relato, uma mulher residente e natural do Paquistão apresentou inicialmente lesões papulares na falange distal do dedo médio na região palmar (paroníquio) e ao longo das pregas das unhas (panarício) que caracterizavam uma infecção bacteriana aguda. Primeiramente ela recebeu um tratamento com uma série de antibióticos de amplo espectro aos quais ela não apresentou resposta. Dois meses após a infecção inicial, ela também desenvolveu um total de 11 lesões nodulares múltiplas estendendo-se sobre o braço direito. Biópsias coradas com Giemsa revelaram amastigotas provavelmente de *L. tropica* e após o tratamento com antimoniato de meglumina (glucantime) na dose de 20 mg/kg/dia por 20 dias, as lesões da falange apresentaram cicatrização completa. No entanto, as lesões esporotricóides do braço não curaram completamente necessitando de crioterapia quinzenalmente até diminuir de tamanho por completo (IFTIKHAR et al., 2003).

Outro caso atípico também foi relatado por Karıncaoglu e colaboradores (2004) ocorrido na península anatoliana, região da Turquia. Uma mulher de 60 anos apresentou uma placa eritematosa, endurecida, levemente escamosa, medindo 10 cm × 5 cm, em forma de borboleta com bordas bem definidas em ambas as bochechas. Os autores definiram esse tipo de lesão como erisipeloide devido a sua semelhança com a infecção bacteriana aguda, causada pelo *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Depois de um tratamento com antibióticos tópicos e sistêmicos sem sucesso, um exame em esfregaços retirados da lesão, revelaram a presença de amastigotas de *Leishmania*, a espécie não foi identificada. Apenas após o tratamento com antimoniato de meglumina sistêmico na dose de 10 mg/kg/dia, por 20 dias a lesão foi controlada.

Um estudo realizado no Equador descreveu três formas clínicas incomuns de LTA identificadas em crianças equatorianas (CALVOPINA et al., 2005). O primeiro caso se trata de lesão erisipelóide e caracterizado por placa eritematosa e endurecida encontrada

na face de um menino de 5 anos. O segundo caso se refere à lesão do tipo “recidiva cútis” e é diferenciada por pápulas marrom-avermelhadas de progressão lenta ao redor de grandes cicatrizes de lesões em uma menina de 6 anos. Por último, um caso de leishmaniose disseminada que é caracterizado por dezenas de úlceras cutâneas distribuídas por todo o corpo de uma menina de 1 ano de idade. Parasitos do gênero *Leishmania* foram obtidos por aspirado de lesão e analisados pela técnica de eletroforese enzimática multilocus (MLEE, sigla do inglês *Multilocus enzyme electrophoresis*). Todos os três isolados foram identificados como *Leishmania (Viannia) panamensis* e o tratamento com antimoniato de meglumina (10 mg/kg/dia por 15 dias) resultou em cura clínica de todos os três pacientes.

Outra lesão incomum, a zosteriforme, foi relatada. Este termo trata-se de erupções cutâneas que surgem seguindo um padrão linear ou em faixa (em inglês: “zoster”) geralmente na região dorsal do corpo. Este caso ocorreu na província de Khozestan, no sul do Irã, onde foram observadas lesões com o padrão multidermatomal nas costas e nádegas de um homem de 60 anos. Um esfregaço da lesão mostrou formas amastigotas de *L. donovani*. Essa infecção apresentou resistência ao tratamento convencional, mas respondeu bem a uma combinação de antimoniato de meglumina, alopurinol e crioterapia (OMIDIAN & MAPAR, 2006).

No Brasil, onde a doença é provocada na maioria das vezes pela *L. braziliensis*, o tipo de lesão atípica mais evidente relatado na literatura é o tipo vesicular (ADRIANO et al., 2013, NEITZKE-ABREU et al., 2014, NICODEMO et al., 2012) conforme levantamento realizado por Meireles e colaboradores (2017).

Não se sabe ao certo as causas do aparecimento das lesões atípicas, embora alguns autores tenham descrito algumas possíveis razões. O estado imunológico do hospedeiro afetado por gravidez, comorbidades, imunossupressão (IFTIKHAR et al., 2003; OMIDIAN & MAPAR, 2006), fatores ambientais envolvendo os vetores e hospedeiros silvestres e cepa do parasito (GUIMARÃES et al., 2016) são causas comumente associadas à LT atípica. Entretanto, a maioria dos pacientes não apresenta comorbidades clínicas ou infecção por HIV e não fazem uso de drogas imunossupressoras (DA-CRUZ et al., 1999). Além disso, *L. braziliensis* é caracterizada por variável infecciosidade, virulência e

resposta a terapêutica antileishmania (RÊGO et al., 2018; PATINO et al., 2019a). Portanto, não há consenso sobre os fatores envolvidos nos casos de LTA atípicas, embora esses dados pareçam sugerir que os fatores parasitários podem ser mais determinantes.

No Brasil, casos de LTA atípica foram relatados nos estados da Bahia (GUIMARÃES et al. 2009, GUIMARÃES et al. 2016), Minas Gerais (QUARESMA et al., 2018), Rio de Janeiro (SILVA et al., 2014) e Ceará (ADRIANO et al., 2013). Guimarães e colaboradores (2009) analisaram a presença de manifestações clínicas atípicas de LTA em todos os pacientes atendidos no Posto de Saúde de Corte da Pedra no estado da Bahia. Dos 1.396 pacientes diagnosticados com LTA, 1,9% dos pacientes apresentaram manifestações atípicas da doença. Esses pacientes apresentavam lesões do tipo exofíticas, sem bordas claras e algumas vezes crostosas. O isolamento do parasito foi realizado em amostras de alguns dos pacientes e em todas elas os parasitos foram identificados como *L. braziliensis*. Outro fato importante é que dos dezenove pacientes, treze apresentaram falha no tratamento com antimônio e as lesões cicatrizaram somente após tratamento com AmB, introduzida após falha de três ou mais cursos de antimônio. Este fato indica uma preocupação acerca da melhor escolha de tratamento para casos de LT atípica (GUIMARÃES et al. 2009).

Posteriormente, em um novo estudo foi mostrado que cepas de *L. braziliensis* isoladas de pacientes com lesões atípicas também apresentaram características genéticas não comumente identificadas entre cepas de *L. braziliensis* de pacientes com sintomatologia clássica. Os genótipos em um locus de 600 pares de bases no cromossomo 28 (CHR28/425451) da *L. braziliensis* foram comparados entre os dois grupos. A análise comparativa indicou que as substituições de citosina-adenina nas posições 254 e 321 foram altamente associadas às lesões atípicas. Além disso, em relação à resposta imune, foi observado que pacientes com lesões atípicas produziram níveis inferiores de INF- γ e TNF e níveis mais elevados de IL-10 e IL-17 em comparação aos pacientes com lesões típicas. Foi possível concluir que as diferenças nos conteúdos antigênicos entre os parasitos podem ser em parte responsáveis pela variação nas respostas de citocinas e

possivelmente pela diferença imunopatológica entre LTA clássica e LTA atípica (GUIMARÃES et al., 2016).

Da-Silva e colaboradores (2014) relataram um caso de uma paciente com LT atípica no estado do Rio de Janeiro. A paciente apresentava co-infecção com HIV e lesões de erupções cutâneas descamativas difusas, podendo ser erroneamente interpretadas como reações adversas aos medicamentos anti-retrovirais. A paciente também apresentou lesões na mucosa nasal, tecido em que foi confirmado por biópsia que se tratava de infecção por *Leishmania braziliensis*. O tratamento específico foi realizado com antimoniato N-metilglucamina resultando em melhora progressiva das lesões.

Formas clínicas variadas de LTA também foram observadas no norte de Minas Gerais, região endêmica de transmissão de *L. braziliensis* em pacientes da reserva indígena Xacriabá, localizada no município de São João das Missões (RÊGO et al. 2018, QUARESMA et al. 2018). A reserva é predominantemente composta por vegetação de cerrado brasileiro, e *Lutzomyia intermedia* é o principal vetor de *L. braziliensis* nesta região (RÊGO et al., 2018). Em pacientes de Xacriabá, a expressão de citocinas/quimiocinas em biópsias de pele está associada à evolução temporal das lesões, mas não ao tipo de lesão. Além disso, a análise histopatológica de amostras de tecido cutâneo não mostrou diferenças entre os pacientes com lesões atípicas e típicas (COSTA-SILVA et al., 2014).

No entanto, ainda que o genoma desses isolados não tenha sido sequenciado, estudos de variabilidade genética apontam correlação com manifestações clínicas típicas e atípicas. Quaresma e colaboradores (2018) avaliaram 87 pacientes com lesões cutâneas nesta região. Destes pacientes, 69% apresentaram lesões atípicas que foram definidas pela presença de lesões cutâneas e classificadas como crostosas, lesão vegetativa, pápulas, placas verrucosas e ulceradas provocadas por *L. braziliensis*. Outro achado deste trabalho se refere à variabilidade genética entre as cepas dos isolados estudados. Amostras de parasitos isolados de pacientes com manifestações clínicas típicas e atípicas foram analisadas por eletroforese de enzima multilocus, polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição hsp70, sequenciamento hsp70 e métodos filogenéticos. Por PCR-RFLP, foram observados dois perfis gênicos, sendo que de 39

amostras avaliadas, apenas duas apresentaram perfil de restrição correspondente à cepa de referência de *L. braziliensis* e 37 apresentaram perfil de restrição correspondente a um padrão variante. Além disso, o dendrograma mostrou uma estrutura populacional potencial do complexo *L. braziliensis*, evidenciando que a maioria das cepas isoladas de pacientes com lesões atípicas apresentava perfil genético variante (QUARESMA et al., 2018).

Além de estarem associadas às variações genéticas do parasito, as manifestações clínicas atípicas se relacionam com menor resposta ao tratamento com antimoniais. Muitas falhas terapêuticas foram observadas em pacientes com lesões atípicas na região de Xacriabá, assim como foi relatado na região da Bahia (GUIMARÃES et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2016). Um estudo *in vitro* de suscetibilidade a fármacos antileishmania relatou que cepas de manifestações atípicas são mais resistentes ao glucantime, o tratamento recomendado pela OMS. As formas promastigotas de *L. braziliensis* isoladas de lesões atípicas também apresentaram redução de 29% na capacidade de infectar macrófagos derivados de monócitos humanos quando comparados com parasitos obtidos de pacientes com lesões típicas. Esses dados indicam diferenças na infectividade e suscetibilidade a fármacos entre *L. braziliensis* isolados de pacientes que apresentam diferentes tipos de lesões (RUGANI et al., 2018). Nesse sentido, a caracterização dessas cepas causadoras de lesões atípicas é de extrema importância para o desfecho do tratamento utilizado na prática clínica.

1.3 Proteômica aplicada em *Leishmania* spp.

Desde procariotos até eucariotos, as proteínas são as moléculas responsáveis por determinar os fenótipos celulares em todos os organismos por meio de suas funções e interações complexas com outras moléculas celulares. Nesse sentido, vários estudos examinaram transcritos para investigar a biologia de *Leishmania* e a relação entre o parasito e o hospedeiro (BUATES & MATLASHEWSKI, 2001; CHAUSSABEL et al., 2003; RODRIGUEZ et al. 2004; PROBST et al., 2012). No entanto, os Trypanosomatídeos controlam a expressão gênica principalmente por meio de mecanismos pós-

transcricionais (CLAYTON et al., 2002; PAAPE et al., 2011). Assim, em *Leishmania*, os níveis de mRNA nem sempre são indicativos da abundância de proteínas codificadas por eles, já que a regulação pós-transcricional pode afetar significativamente a abundância proteica. Além disso, a análise de RNA não fornece informações sobre outros processos que afetam a função e atividade proteica, como interações proteína-proteína, transporte e degradação. Portanto, a proteômica deve ser considerada uma ferramenta crítica para estudos que visem a uma melhor compreensão de *Leishmania* e sua interação com o hospedeiro (VERAS & MENEZES, 2016).

O proteoma representa um conjunto de proteínas expressas pelo genoma, célula ou tecido em um determinado momento e, além de ser bastante complexo, é dinâmico e se modifica sob diferentes condições, podendo se distinguir em diferentes tecidos de um único organismo. A proteômica por sua vez, consiste na análise global dos conjuntos de proteínas e suas proteoformas presentes em uma amostra biológica, dispondo de ferramentas tecnológicas que buscam identificar e quantificar as proteínas (WILKINS et al., 1996).

Através da proteômica, que visa identificar a identidade, quantidade e função das proteínas, é possível investigar o proteoma por meio de ferramentas tecnológicas disponíveis. As metodologias empregadas podem ser classificadas nos tipos *bottom-up* ou *top-down*. O termo *bottom-up* também chamado de *shotgun* inclui separação por cromatografia líquida dos peptídeos obtidos após digestão enzimática de soluções proteicas complexas, seguida de análise por espectrometria de massa (MS do inglês “*mass spectrometry*”). O *top-down*, por outro lado, é um processo no qual as proteínas intactas são submetidas à análise por MS sem digestão enzimática (BARBOSA et al., 2012).

As diversas abordagens proteômicas foram desenvolvidas para analisar as misturas de proteínas complexas com maior sensibilidade, como é o caso da proteômica baseada em MS. A MS é uma técnica que pode ser aplicada em larga escala e usada para medir a relação massa/carga (m/z), portanto, é útil para determinar a massa molecular das proteínas/peptídeos e suas sequências. A análise por espectrometria de massa compreende basicamente três etapas. Primeiramente as moléculas são ionizadas. Nesta

etapa, as técnicas de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (em inglês, MALDI) e por electrospray (ESI) permitem a ionização de moléculas não voláteis e de alta massa molecular, como proteínas e peptídeos, abrindo novos caminhos para a proteômica (HORVATÍĆ et al., 2016). Na segunda etapa ocorre a separação de íons com base em valores de m/z na presença de campos elétricos ou magnéticos. Finalmente, os íons separados possuem seu valor m/z detectados (ASLAM et al. 2017). Além dessas etapas, os íons podem ser fragmentados, gerando os espectros de massa em tandem (MS/MS) que resultam na identificação da sequência de aminoácidos do peptídeo.

Para obtenção de análises proteômicas, a combinação da eletroforese bidimensional (2DE) e espectrometria de massa é comumente empregada. Essa técnica envolve o uso de géis de poliacrilamida para separar as proteínas com base no seu ponto isoelétrico na primeira dimensão, seguida da separação dessas proteínas com base em sua massa molecular na segunda dimensão. Ao longo do tempo, a técnica de 2DE passou por várias melhorias, que permitiram a análise proteômica quantitativa, além de aprimoramentos na resolução e reprodutibilidade dos géis. O uso de corantes fluorescentes nessa técnica tem se tornado cada vez mais comum, especialmente após o desenvolvimento da técnica de eletroforese diferencial em gel bidimensional (Differential Gel Electrophoresis – DIGE - HEYWOOD et al., 2011). O DIGE utiliza três corantes fluorescentes distintos que se ligam covalentemente aos resíduos de lisina das proteínas em diferentes amostras, sem interferir na migração dessas proteínas durante a corrida eletroforética. Isso permite a comparação de duas ou três amostras proteicas simultaneamente em um mesmo gel de poliacrilamida, o que aumenta significativamente a reprodutibilidade e sensibilidade da técnica (MAROUGA et al., 2005).

Outra abordagem desenvolvida para a proteômica quantitativa é a marcação de isótopo estável (SIL, do inglês *stable-isotope labeling*). Esses métodos incluem *tags* isobáricas para quantificação relativa multiplex de peptídeos como o iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification* - ROSS et al., 2004) e o TMT (*Tandem Mass Tag* - THOMPSON et al., 2003). A marcação ocorre entre o grupo amino reativo da *tag* com aminas primárias localizadas na porção N-terminal dos peptídeos e/ou na cadeia lateral dos resíduos de lisina. Nessa abordagem, os peptídeos marcados com diferentes *tags*

isobáricas são indistinguíveis em MS. Porém, durante a fragmentação do peptídeo no espectrômetro de massa, ocorre a liberação dos íons repórteres, com massas diferentes em MS/MS. A razão das intensidades dos diferentes íons repórteres permite a quantificação das proteínas (ZHANG et al., 2014). Essa abordagem de quantificação tem sido amplamente utilizada para identificar as alterações simultâneas das proteínas em diferentes condições, contribuindo consideravelmente para entender o mecanismo de uma doença (WIESE et al., 2007).

Outra maneira efetiva de quantificar peptídeos é a técnica de quantificação sem marcação (*label-free*). Esta abordagem compara a quantidade de proteínas em diversas amostras sem a necessidade de utilizar marcadores isobáricos. Cada amostra é analisada separadamente no espectrômetro, o que torna necessário um alto grau de precisão na preparação das amostras. Além disso, o tempo necessário para a análise aumenta significativamente conforme o número de grupos experimentais e réplicas (PORTEUS et al., 2011)

Depois que o banco de dados GeneDB foi disponibilizado para uso público, com uma plataforma inicialmente para o genoma de *L. major* em 2005 e posteriormente para os genomas sequenciados de *L. infantum* e *L. braziliensis* em 2007, houve um aumento significativo no número de estudos e na identificação de proteínas de *Leishmania* por meio de análises proteômicas, conforme relatado por Hertz-Fowler et al. (2004). Desde então, a proteômica quantitativa tem sido utilizada em estudos com várias espécies de *Leishmania* que visam compreender os diversos aspectos da biologia do parasito.

Dea-Ayuela et al. (2006) avaliaram as proteínas imunogênicas de promastigotas de *L. infantum* usando Géis Bidimensionais, Western blot e Espectrometria de Massa. Eles identificaram um total de 29 proteínas em 72 spots. Em 2006, Forgber et al. avaliaram 1067 spots em um gel bidimensional e identificaram seis proteínas por Espectrometria de Massa, entre 330 spots antigênicos. Costa et al. (2011) utilizaram DIGE para comparar proteínas expressas diferencialmente entre amastigotas e promastigotas de *L. infantum*, e identificaram proteínas antigênicas associando 2DE e Western Blot com soros caninos. Carnielli et al. (2014) também utilizaram DIGE e identificaram proteínas possivelmente relacionadas à resistência ao miltefosine, enquanto Pires et al. (2014) investigaram

proteínas com abundância diferente em duas cepas de *L. infantum* e encontraram proteínas possivelmente relacionadas à virulência. Magalhães et al. (2014) demonstraram que o cultivo prolongado de *L. amazonensis* pode levar à perda de infectividade das promastigotas axênicas. Usando 2DE e MS/MS, eles identificaram que proteínas importantes para a infectividade do parasita, como triparedoxina peroxidase, metalopeptidases, HSP70 e dissulfeto isomerase, tiveram sua abundância progressivamente reduzida durante 150 dias de cultivo. Moreira et al 2015 realizaram um estudo comparando linhagens de *L. braziliensis* resistentes e susceptíveis ao antimônio (SbIII) por análise fosfoproteômica usando 2D-DIGE seguida de MS. Este novo estudo permitiu traçar o perfil do fosfoproteoma de *L. braziliensis*, identificando vários candidatos potenciais para redes bioquímicas ou de sinalização associadas ao fenótipo de resistência ao antimônio neste parasito.

Trabalhos recentes utilizaram shotgun para elucidar a biologia de *Leishmania* e sua interação com o hospedeiro. Pawar e colaboradores (2020) descreveram um método detalhado de marcação por TMT e espectrometria de massa para estudar as mudanças dinâmicas nos níveis de abundância de proteínas durante a diferenciação em *L. donovani* (PAWAR et al., 2020). Outro estudo proteômico utilizando marcadores isobáricos foi realizado para entender a biologia de *L. donovani*. O estudo de quantificação proteica por iTRAQ realizado por Singh et al. (2015) comparou os perfis de expressão de proteínas de células de linhagem monocítica humana infectadas ou não com *L. donovani* e detectou indícios de que o parasito reprograma o metabolismo celular da célula infectada. Dentre as alterações relatadas, destaca-se o aumento na abundância de proteínas envolvidas na transcrição, splicing de RNA, reparo e replicação do DNA. Oliveira et al (2022) com o objetivo de identificar proteínas com abundância diferencial em macrófagos BALB/c infectados com diferentes espécies de *Leishmania* realizaram uma análise proteômica comparativa usando as técnicas DIGE e TMT seguida por LC-MS/MS. A análise de ontologia gênica indicou que a infecção interfere nos mecanismos apoptóticos e induz alterações epigenéticas que afetam a transcrição gênica. Além disso, a regulação negativa de proteínas como PYCARD e MyD88 parece influenciar o processo inflamatório na infecção por *L. amazonensis*, enquanto a regulação positiva de TAP1 e ERAP1 está envolvida na resposta imune adaptativa na infecção por *L. infantum*. Já Fialho-Junior e

colaboradores (2021) tiveram o objetivo de identificar proteínas diferencialmente abundantes envolvidas na virulência de formas amastigotas e promastigotas de *L. infantum*. Os resultados mostraram que na forma amastigota da cepa mais virulenta, havia um grande grupo de proteínas relacionadas à glicólise, choque térmico e proteínas ribossomais, enquanto na forma promastigota além de proteínas relacionadas ao choque térmico e aos ribossomos o grupo também apresentava proteínas reguladas relacionadas com resposta ao estresse (FIALHO-JUNIOR et al., 2021). Também utilizando a abordagem proteômica quantitativa TMT, Negrão e colaboradores (2019) estudaram aspectos da infecção por *Leishmania* spp. O grupo investigou a modulação de proteínas em macrófagos murinos (modelo *in vitro*) e biópsias de pele (modelo murino *in vivo*) após exposição a *Leishmania* spp. Infecções induzidas por *L. amazonensis* e *L. major* foram comparados a um modelo de inflamação para pesquisar a modulação de proteínas específicas e inespecíficas de *Leishmania* no hospedeiro. Várias proteínas que foram alteradas após a infecção com *Leishmania* spp. fornecem candidatos interessantes para uma investigação mais aprofundada sobre o mecanismo da doença e desenvolvimento de possíveis imunoterapias.

Por meio da técnica *label free* Oliveira et al. (2020) avaliaram o subproteoma da membrana plasmática de *L. infantum* e *L. amazonensis*. Neste estudo 6 proteínas foram detectadas apenas em *L. infantum* e 39 proteínas eram exclusivas de *L. amazonensis* incluindo a proteína ABCA9. Dentre as proteínas encontradas em ambas a espécies está a GP63, um fator de virulência bem conhecido. Trabalhos como este podem fornecer uma melhor compreensão biológica desses parasitos. Outro estudo utilizando a técnica de quantificação sem marcação analisou o conteúdo de proteína total dos secretomas de sete espécies de *Leishmania* cultivadas *in vitro*. O núcleo secretoma comum a todas as espécies corresponde a cerca de um terço das proteínas secretadas, indicando mecanismos conservados de adaptação ao hospedeiro vertebrado. As proteínas identificadas como exclusivas de algumas espécies podem fornecer informações relevantes sobre sua patogênese (PISSARRA et al., 2022). Tagliazucchi et al. (2023) usaram da abordagem de MS *label free* para identificar as vias bioquímicas de células THP-1 infectadas por diferentes cepas de *L. infantum* isoladas de pacientes com resistência ou com resultado de falha terapêutica. As análises identificaram o receptor de

transferrina C (TFRC) e o nucleosídeo difosfato quinase 3 (NDK3) como proteínas com aumento de abundância em células THP-1 infectadas com cepas de *L. infantum* resistentes à paromomicina, antimônio e miltefosina.

Para compreender um sistema biológico em nível molecular, além de identificar e caracterizar genes e proteínas é igualmente importante construir mapas que mostrem as interações entre essas entidades moleculares, incluindo sua localização, vias e comunicação. O objetivo de alcançar tais “mapas relacionais” ficou conhecido como biologia de rede, um campo de pesquisa dedicado a entender a estrutura e dinâmica das interações complexas entre os componentes celulares, como as proteínas, DNA, RNA e outras moléculas. O estudo da rede de interações é um desafio crucial para a biologia na atualidade, pois essas interações desempenham um papel fundamental na estrutura e função das células e seus organismos como um todo (BARABASI et al. 2004). Tais interações podem ser do tipo física, regulatória, genética, estrutural ou funcional, sendo que as interações físicas envolvem o contato direto ou indireto entre biomoléculas, como as interações proteína-proteína (PPIs) que ocorrem em processos como a formação de complexos proteicos, ativação de ligantes em receptores de proteínas e cascatas de sinalização por fosforilação.

As redes de interação proteína-proteína são definidas como contatos físicos com docking molecular entre proteínas, ocorrendo dentro de uma célula ou organismo vivo (RIVAS & FONTANILLO 2010). Essas redes podem ser ilustradas como grafos, em que as proteínas são representadas por nós e as interações são representadas por arestas. As análises das redes de PPI ajudam a identificar proteínas-chave envolvidas em processos celulares específicos, a desvendar vias de sinalização e a identificar alvos para o desenvolvimento de terapias direcionadas. Além disso, a integração de dados de diferentes fontes, como genômica e interatomômica, permite uma compreensão mais abrangente das redes de interação e suas implicações biológicas (RIVAS & FONTANILLO 2012).

Técnicas proteômicas podem, portanto, auxiliar no entendimento da biologia do parasito, da sua interação com o hospedeiro e dos fatores envolvidos na ampla diversidade de

manifestações clínicas. Desta forma, pode-se preencher as lacunas ainda existentes acerca das leishmanioses, incluindo a caracterização de lesões típicas e atípicas.

2 JUSTIFICATIVA

Casos de lesões atípicas na Leishmaniose tegumentar têm aumentado nos últimos anos e podem afetar os programas de eliminação dessa doença devido à dificuldade para o diagnóstico e tratamento. Ao mesmo tempo, ainda não existe um consenso sobre os fatores que envolvam os casos de lesões atípicas em leishmaniose, embora alguns autores sugiram que tanto o estado imunológico do paciente quanto variantes genéticas do parasito possam estar envolvidas nessas formas clínicas.

Como já relatado, recentemente foram obtidos alguns isolados de *L. braziliensis* provenientes de pacientes da reserva indígena Xacriabá/São João das Missões – Minas Gerais, que estavam associados a ocorrência de lesões atípicas (QUARESMA et al., 2018; RÉGO et al. 2018). Esses isolados mostraram resistência ao tratamento convencional com antimônio (RUGANI, 2018) e apresentavam um padrão genético variante (QUARESMA et al., 2018).

Todavia, ainda não estão esclarecidos mecanismos, principalmente por parte dos parasitos, que influenciam as manifestações das lesões atípicas. Assim, propomos neste trabalho realizar um estudo para identificar proteínas diferencialmente abundantes entre isolados de *L. braziliensis* com genótipo variante e causadores de lesões atípicas em comparação com isolados de genótipo não variante e causadores de lesões típicas.

Por outro lado, os avanços na área da proteômica têm permitido a identificação de pequenas diferenças na abundância de proteínas que contribuem para uma melhor compreensão dos sistemas biológicos. Além disso, essas ferramentas possibilitam estudos de vias metabólicas da fisiologia do parasito, visto que as técnicas existentes dão acesso a uma visão mais global e integrada de processos biológicos por meio do estudo de todas as proteínas e não somente de uma isoladamente (VERAS & MENEZES, 2016). Assim, estudos proteômicos de populações de parasitos que infectam diferentes hospedeiros em regiões geográficas distintas são de grande importância para o entendimento da epidemiologia das doenças por eles causadas. Além disso, podem

contribuir para esclarecer o papel biológico de proteínas com relação à virulência, patogenicidade, resistência a drogas, dentre outras características. Nesse contexto, de posse de amostras de isolados de *L. braziliensis* causadores de lesões atípicas e típicas nos propusemos a fazer uma análise de proteoma quantitativo para identificar proteínas diferencialmente abundantes entre esses grupos de isolados e correlacioná-las com as características biológicas desses isolados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar proteínas diferencialmente abundantes entre isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* caracterizados como agentes de lesões atípicas e típicas.

3.2 Objetivos específicos

- Obter o perfil proteômico de isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* caracterizados como agentes de lesões atípicas e típicas;
- Identificar e caracterizar as proteínas diferencialmente abundantes entre os grupos de isolados;
- Validar a regulação de proteínas diferencialmente abundantes por meio de testes de atividade enzimática.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Declaração de ética

Cepas de *Leishmania braziliensis* foram obtidas de pacientes humanos que vivem na comunidade indígena Xacriabá localizada no município de São João das Missões, Minas Gerais, Brasil (QUARESMA et al., 2018). Amostras de outras áreas endêmicas foram obtidas no ambulatório do Centro de Referência em Leishmanioses – Instituto René Rachou-IRR/FIOCRUZ de 1993 a 1998. Todos os pacientes envolvidos neste estudo forneceram consentimento informado por escrito e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IRR, Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP; processo 355/2008) e Fundação Nacional do Índio (FUNAI; nº 149/CGEP/08).

4.2 Parasitos

As cepas de *L. braziliensis* de lesões típicas (LbLT) foram isoladas de pacientes de Belo Horizonte, MG, Brasil, identificadas como MHOM/BR/95/RR051 e BH17 e de São João das Missões, MG, Brasil identificadas como MHOM/BR/08/426 e MHOM/BR/09/346. As cepas de lesões atípicas (LbLA) foram isoladas de pacientes de São João das Missões, MG, Brasil, identificadas como MHOM/BR/08/316 e MHOM/BR/08/340. As características clínicas de lesões típicas e atípicas das quais os parasitos foram isolados foram realizadas conforme descrito por Quaresma e colaboradores (2018). Em resumo, as lesões típicas caracterizaram-se como úlceras circulares ou ovaladas de aspecto eritematoso, infiltrado, firme, avermelhado e base granular e borda elevada bem delimitada. Lesões atípicas foram definidas pela presença de feridas cutâneas incomuns.

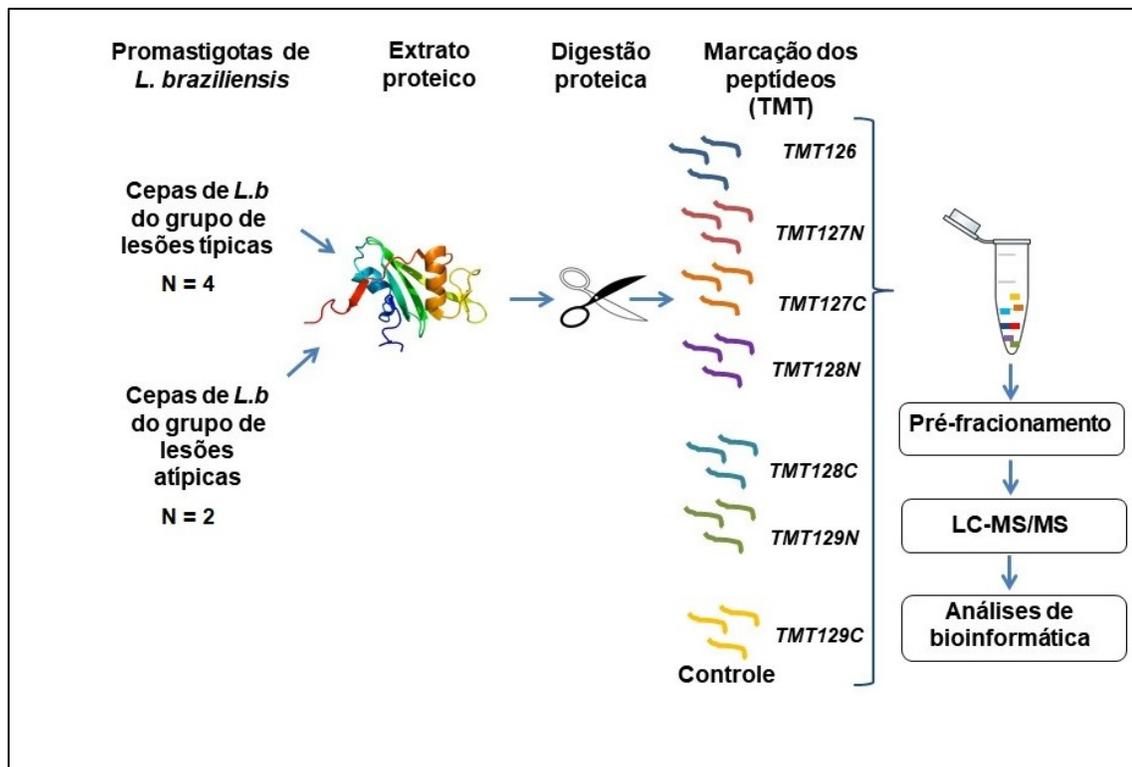
O procedimento de isolamento foi realizado adicionando fragmentos de lesão em tubos contendo meio NNN (Novy e McNeal, 1903; Nicolle, 1908) enriquecido com meio líquido de Schneider e incubado a 25 ± 1 °C. As culturas foram examinadas semanalmente e foram consideradas positivas quando formas promastigotas de *Leishmania* foram observadas. Os métodos de identificação da espécie realizados para caracterizar os isolados usados neste estudo foram realizados pelo Isolamento de *Leishmania*, Cultura

e Serviço de tipagem da Coleção de *Leishmania* do Oswaldo Cruz Instituto (CLIOC) de acordo com o protocolo descrito por Cupolillo e colaboradores (1994). Também foi previamente realizado hsp70-PCR-RFLP que amplificou um fragmento de 1300 pb do gene hsp70 e posteriormente os perfis de restrição foram obtidos pela digestão com a enzima *HaeIII* dos produtos de PCR. Além desses métodos, foi realizado o sequenciamento do fragmento de 1.300 pb da hsp70. A combinação de métodos de identificação permitiu a caracterização dos parasitos como *L. braziliensis*.

Promastigotas de *L. braziliensis* foram mantidas em meio de cultura M199 (SigmaAldrich/Merck) suplementado com 10% soro fetal bovino (ThermoFischer/Gibco), 100 unidades/mL de penicilina (ThermoFischer/Gibco), 100 µg/mL de estreptomicina (ThermoFischer/Gibco), 12,5 mM de glutamina (ThermoFischer/ Gibco), 0,1 M de adenina (SigmaAldrich/Merck), 205 µg/mL de hemina e 40 mM HEPES (SigmaAldrich/Merck), pH 7,4 a 26 °C. Ao todo, seis isolados foram avaliados: quatro de lesões típicas e dois de lesões atípicas. Todas as cepas foram cultivadas em triplicatas independentes sob condições idênticas até a 9ª passagem, quando as promastigotas foram obtidas na fase final de crescimento estacionário. Esta fase foi estabelecida após a realização da curva de crescimento por oito dias consecutivos. Durante este período, a motilidade e a aspectos morfológicos como corpo celular e comprimento do flagelo também foram observados. Assim, formas promastigotas foram colhidas na fase estacionária (5º dia) por centrifugação a 3.000 x g por 15 min a 4 °C. Os parasitos foram lavados três vezes em tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,2, e congelados a -80 °C até o uso.

4.3 Delineamento experimental

A Figura 2 mostra o fluxograma do desenho experimental seguido para a análise diferencial de abundância das proteínas entre isoladas de *L. braziliensis*.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 2. Delineamento experimental: Foram analisadas proteínas de formas promastigotas de 4 isolados de pacientes com lesões típicas (LbLT) e 2 isolados de pacientes com lesões atípicas LbLA). O extrato proteico de cada isolado foi submetido à digestão trípica, e os peptídeos resultantes foram marcados com *tags* isobáricas e combinados na proporção de 1:1:1:1:1:1:1. Um grupo "controle" contendo a *pool* das quantidades iguais de peptídeos de cada isolado foi acrescentado como uma amostra adicional. Anteriormente à análise por LC-MS/MS, os peptídeos foram pré-fracionados por cromatografia de fase reversa em solução com pH elevado. Análises de bioinformática foram realizadas para identificação e caracterização das proteínas.

4.4 Proteômica

4.4.1. Extração de proteínas e marcação com TMT

As promastigotas criopreservadas (LbLA e LbLT) foram lisadas por 2 h a 24°C em tampão de lise (8 M de uréia, 2 M de tiouréia, 4% de CHAPS, 65 mM de ditioneitol (DTT), 1 M de Tris, 40 mM de coquetel de inibidores de proteases contendo inibidores de serino proteases e cisteíno proteases (*Protease Inhibitor Mix* – GE Healthcare)) a uma densidade de 500 µL por 10⁹ parasitos. O lisado celular foi passado 10 vezes através de uma agulha 26G e centrifugado a 20.000 × *g* por 20 min. O sobrenadante foi aliqotado

e armazenado a -80°C até o uso. A concentração de proteína foi determinada usando o QuantKit 2D (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante.

Quantidades iguais de proteína (300 μg) de cada amostra foram reduzidas com 50 mM ditioneitol (DTT) por 1 h a 24°C e subsequentemente alquiladas com 150 mM de iodoacetamida (IAA) por 30 min à temperatura ambiente sob proteção da luz. Antes da etapa de digestão, as amostras foram lavadas com dois tampões (6 M de ureia seguido de lavagem com 50 mM de TEAB) para remover o CHAPS presente no tampão de lise, utilizando filtros (Micon Ultra-0,5 mL - Millipore). A digestão enzimática foi realizada com tripsina (Promega, Madison) na razão de 1:50 por 16 h a 37°C .

Após a digestão das proteínas, os peptídeos foram marcados com isóbaros específicos do kit TMT 10plex Isobaric Mass Tagging (Thermo Fisher Scientific/Pierce Biotechnology, Rockford, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 15 μg de cada amostra foram marcados com 0,266 mg de um marcador reativo a amina isobárica (TMT10-126, TMT10-127N, TMT10-127C, TMT10-128N, TMT10-128C e TMT10-129N – Tabela 1). A mistura foi incubada durante uma hora à temperatura ambiente para marcação completa. A reação foi extinta pela adição de 5% de hidroxilamina e os peptídeos marcados foram combinados na proporção de 1:1:1:1:1:1. As amostras foram secas usando um SpeedVac e armazenadas para análise posterior. O processo de preparação foi realizado em triplicatas técnicas independentes.

Tabela 1 – Delineamento experimental para marcação das amostras com TMT

Marcação	Replicatas biológicas e técnicas			
Tags	Grupo	Set 1	Set 2	Set 3
TMT126	LbLT	<i>MHOM/BR/08/426-a</i>	<i>MHOM/BR/08/426-b</i>	<i>MHOM/BR/08/426-c</i>
TMT127N	LbLT	<i>MHOM/BR/95/RR051-a</i>	<i>MHOM/BR/95/RR051-b</i>	<i>MHOM/BR/95/RR051-c</i>
TMT127C	LbLT	<i>BH17-a</i>	<i>BH17-b</i>	<i>BH17-c</i>
TMT128N	LbLT	<i>MHOM/BR/09/346-a</i>	<i>MHOM/BR/09/346-b</i>	<i>MHOM/BR/09/346-c</i>
TMT128C	LbLA	<i>MHOM/BR/08/316-a</i>	<i>MHOM/BR/08/316-b</i>	<i>MHOM/BR/08/316-c</i>
TMT129N	LbLA	<i>MHOM/BR/08/340-a</i>	<i>MHOM/BR/08/340-b</i>	<i>MHOM/BR/08/340-c</i>
TMT 129C	Pool*	<i>Controle</i>	<i>Controle</i>	<i>Controle</i>

*Pool contendo 2 µg de cada uma das 18 amostras.

4.4.2 Pré-fracionamento dos peptídeos por Cromatografia Líquida em Fase Reversa em pH elevado

Cada *set* de peptídeos marcados foi ressuspensionado em tampão A (20 mM formiato de amônio, pH 9,3) e fracionado usando uma Coluna C18 Acquity UPLC M-Class CSH (1,7 µm, 300 µm x 100 µm) (Waters) em sistema de cromatografia líquida de alta pressão UltiMate 3000 (HPLC) (Dionex, Sunnyvale, CA, EUA) operando a 5 µL/min. Cada *set* foi eluído usando o seguinte gradiente cromatográfico expresso como uma porcentagem de solvente B (solução A 20%/80% ACN): 2–40% por 27 min, 40–50% em 4 min, 50–70% em 4 min e 70–95% em 5 min. Cada *set* foi separado em 15 frações que foram posteriormente combinadas em cinco frações concatenadas e secas usando um SpeedVac antes da análise por MS.

4.4.3 LC-MS/MS

Os peptídeos marcados com TMT pré-fracionados foram ressuspensos em solvente A (0,1% (v/v) de ácido fórmico) e posteriormente injetado em um sistema de duas colunas no EASY-nLC (Thermo). A pré-coluna (3 cm de comprimento x 100 µm de diâmetro) foi preenchida com resina Reprosil-Pur C18-AQ (Dr. Maisch GmbH) de partículas com 5 µm de diâmetro. A coluna analítica (17 cm x 75 µm) foi preenchida com a mesma resina, porém com partículas de 3 µm diâmetro. Os peptídeos de cada fração foram eluídos por 68 min usando o seguinte gradiente expresso em porcentagem da solução B (95% de acetonitrila/0,1% de ácido fórmico): 2–5% em 1 min, 5–25% em 50 min, 25–40% em 10 min, 40–95% em 1 min, 95% em 5 min e 95–2% em 1 min, a um fluxo constante de 300 nL/min.

O espectrômetro de massa híbrido QExactive HF-X quadrupolo-Orbitrap (Thermo) foi operado no modo positivo usando aquisição dependente de dados (DDA) (Top 20). Os íons dos peptídeos foram resolvidos no Orbitrap (MS), na faixa de 350 a 1500 m/z com uma resolução de 120.000 FWHM (AGC *target* 3e⁶ ou tempo máximo de injeção de 50 ms). Em cada MS, os 20 íons mais intensos (Top 20), com AGC *target* mínimo de 1e³, foram selecionados no quadrupolo, usando uma janela de isolamento igual a 0,7 m/z. Esses íons foram selecionados para fragmentação (MS2) por dissociação de colisão de alta energia (HCD, sigla do inglês), com energia de colisão de 33%. Os íons fragmentos foram resolvidos no orbitrap com uma resolução de 45.000 FWHM (AGC *target* 1e⁵ ou tempo máximo de injeção de 60 ms) e incluído em uma lista dinâmica de exclusão por 30 s.

4.4.4 Análise de Dados

Os dados brutos foram analisados usando o software Proteome Discoverer 2.4. A busca foi realizada pelo algoritmo SEQUEST contra o banco de dados de *L. braziliensis* (25.611 sequências) do NCBI. Os parâmetros de busca contra o banco de dados incluíram: i) máximo de duas clivagens ausentes de tripsina, ii) carbamidometilação de cisteína como uma modificação fixa, iii) oxidação de metionina, acetilação N-terminal de proteína e TMT 6plex (lisina e N-terminal do peptídeo) como modificações variáveis, iv) tolerância de

massa do íon precursor e íons fragmento de 10 ppm e 0,02 Da, respectivamente; v) 1% de taxa de falsa descoberta (FDR, sigla do inglês); e vi) peptídeos únicos mais *razor* peptídeos foram agrupados nas respectivas proteínas. Apenas proteínas *masters* com 1% FDR foram consideradas para a análise.

Antes das análises estatísticas, a abundância dos íons repórteres foram transformados em log₂ e normalizados usando a amostra "controle" (*pool* de todas as amostras analisadas) para cada um dos três conjuntos de dados. Posteriormente, os dados foram normalizados subtraindo-se a mediana de cada *tag* usando o programa Perseus (<https://maxquant.net/Perseus>). Depois de combinar os três *sets*, subtraímos a média de todas as condições (biológicas/técnicas) para cada proteína. Proteínas reguladas significativamente entre as condições LbLA e LbLT foram determinadas pelo teste estatístico one-way ANOVA ($P < 0,05$) mais log₂ do fold change de 0,584, usando Software DanteR (POLPITIYA et al., 2008).

As proteínas diferencialmente abundantes foram categorizadas funcionalmente através de anotações de processos biológicos (PB) e funções moleculares (FM) catalogadas de acordo com o consórcio Gene Ontology (GO). Os dados foram analisados usando a plataforma de bioinformática versão TriTrypDB 40 (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Para cada categoria, o teste exato de Fisher foi usado para testar o enriquecimento de proteínas selecionadas contra todas as proteínas identificadas no estudo. O FDR e o valor de P ajustado ($p < 0,05$) foram definidos como limites significativos do enriquecimento funcional.

Para avaliar a interação potencial entre as proteínas presentes nas categorias enriquecidas de GO, previmos as redes de interação proteína-proteína associadas ao proteoma total do organismo. Para esta análise, usamos o banco de dados STRING 11.0 (<http://string-db.org>) com valor de corte de 0,4 considerado de média confiança. Este banco de dados fornece as redes de interações que incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais). Os dados decorrem da previsão computacional, da transferência de conhecimento entre organismos e das interações agregadas de outros bancos de dados (primários). Como arquivo de entrada nós utilizamos os códigos ID (GI number) das proteínas selecionadas para cada objetivo em questão, que foi então analisado

contra o banco de dados fornecido pela plataforma em que o organismo selecionado foi *Leishmania braziliensis*, cepa M2904 contendo até o momento 8084 proteínas (<https://version-11-0.string-db.org/organism/5660>). Finalmente, o banco de dados KEGG (do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) foi usado para analisar o enriquecimento de vias de sinalizações (plataforma de bioinformática TritypDB) das proteínas diferencialmente abundantes identificadas.

4.4.5 Disponibilidade de Dados

Os dados do proteoma obtido por espectrometria de massa foram depositados no Consórcio ProteomeXchange através do repositório parceiro PRIDE com o identificador de conjunto de dados PXD029995.

4.5 Validação Funcional dos Dados Proteômicos

4.5.1 Atividade Peroxidase

A atividade de peroxidase foi dosada usando 10^8 promastigotas de cada cepa dos grupos LbLA e LbLT. Formas promastigotas foram lisadas por agitação suave em 50 mL de 0,1% Triton X-100 por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi incubada com 50 μ M peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - concentração final) a 37°C por diferentes intervalos de tempo. A reação foi interrompida pela adição de 0,75 mL da solução de ácido tricloroacético (8% v/v), e o precipitado foi removido por centrifugação. Ao sobrenadante, 0,2 mL de 10 mM de sulfato ferroso de amônio e 0,1 mL de 2,5M de tiocianato de potássio foram adicionados, e a quantidade restante de H_2O_2 foi determinada espectrofotometricamente (480 nm) por calibração contra uma curva padrão com concentrações conhecidas de H_2O_2 (Jiang et al., 2005). As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os dados foram apresentados como a média das replicatas. Comparações entre os diferentes grupos foram feitas usando one-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, e a significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.5 Proteômica de *L. braziliensis*

Proteínas totais de promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* foram obtidas através da lise em tampão alcalino para posterior análise quantitativa por meio da estratégia de marcação isobárica e espectrometria de massa de alta resolução. O experimento foi realizado com 4 replicatas biológicas de cepa típica (LbLT) e 2 replicatas biológicas de cepas atípicas (LbLA), analisadas em triplicatas técnicas independentes (*set* 1, *set* 2 e *set* 3). Cada *set* foi pré-fracionado em 15 frações que foram combinadas em apenas cinco para serem analisadas por LC-MS/MS. Essa etapa foi realizada para diminuir a complexidade da amostra e aumentar a identificação. A figura 3 mostra o perfil cromatográfico semelhante entre as três replicatas técnicas, sendo o *set* 1 mais distinto entre elas.

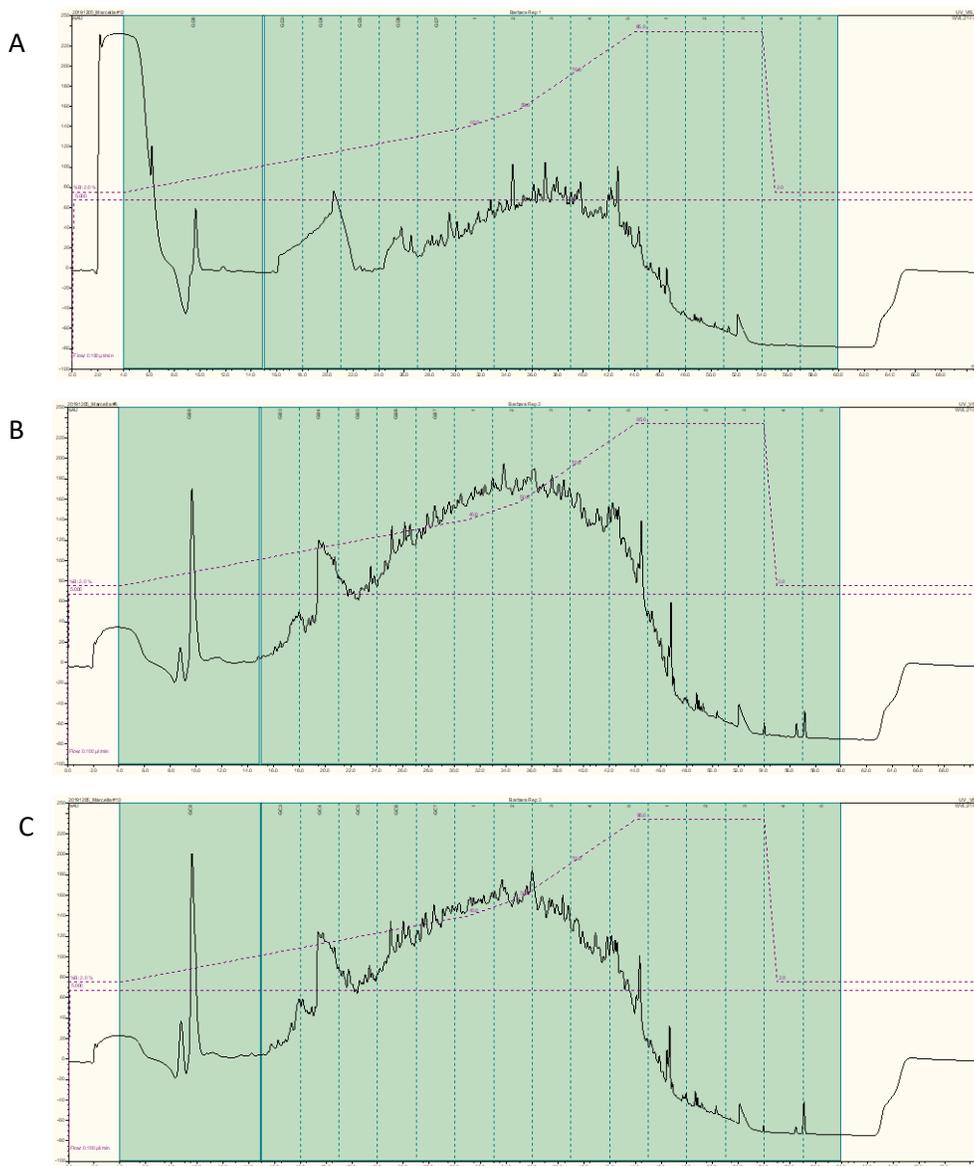


Figura 3. Perfil cromatográfico de cada replicata técnica A. *Set 1*. B. *Set 2*. C. *Set 3*. Os peptídeos foram pré-fractionados por fase reversa em pH alto e cada *set* foi separado em 15 frações que foram posteriormente concatenadas em cinco frações e finalmente analisadas por LC-MS/MS.

A abordagem em questão possibilitou a identificação de 4.048 proteínas não redundantes, das quais 2.229 proteínas estavam presentes em todas as três replicatas independentes (Figura 4A). Do total de proteínas encontradas, 39% são consideradas proteínas hipotéticas e 61% das proteínas possuem alguma descrição (Figura 4B).

Para melhor entender o acervo geral das proteínas encontradas, foi realizada uma análise de categorização de ontologia gênica (Gene Ontology - GO) em que as proteínas foram agrupadas de acordo com as funções moleculares (FM), processos biológicos (PB) e componentes celulares (CC). O total de 1977 proteínas possuem informações a respeito de suas funções moleculares e foram agrupadas em 332 categorias. As categorias com maior representatividade foram “Atividade Catalítica” abrigoando 22,8 % das proteínas, seguida de “Ligação de Proteínas” com 12,5% das proteínas e “Ligação de Nucleotídeos” com 10,2% das proteínas (Figura 5A e Tabela 2). Considerando as categorias relacionadas aos processos biológicos, o total de 1453 proteínas foram distribuídas em 270 categorias. “Processos metabólicos”, “transportes” e “regulação de processos biológicos” foram as categorias com maior representatividade com 40,5%, 8,3% e 6% das proteínas, respectivamente (Figura 5B e Tabela 2). A categorização por componentes celulares abrangeu 922 proteínas e 133 categorias. O total de 21,1% das proteínas pertence à categoria de “componente integral de membrana”, sendo a categoria de CC mais representativa. “Citoplasma” e “ribossomo” também são componentes que se destacaram com 15,8% e 10,4% das proteínas, respectivamente (Figura 5C e Tabela 2).

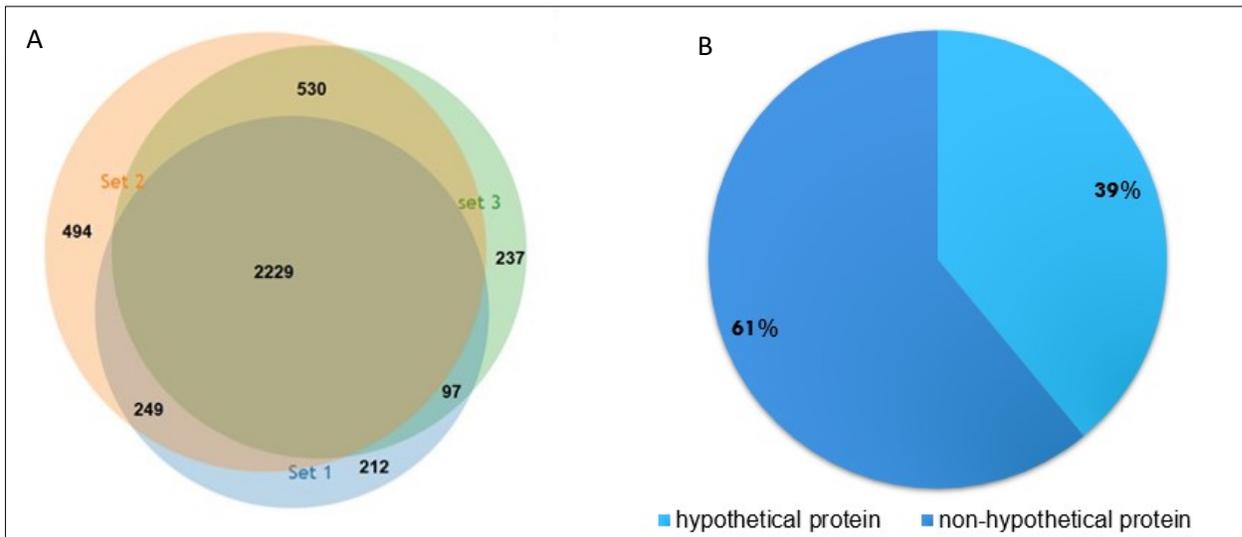


Figura 4. Identificação de proteínas em três replicatas experimentais. A. Diagrama de Venn mostrando as 4.048 proteínas identificadas considerando todas as replicatas independentes. B. Distribuição das proteínas hipotéticas.

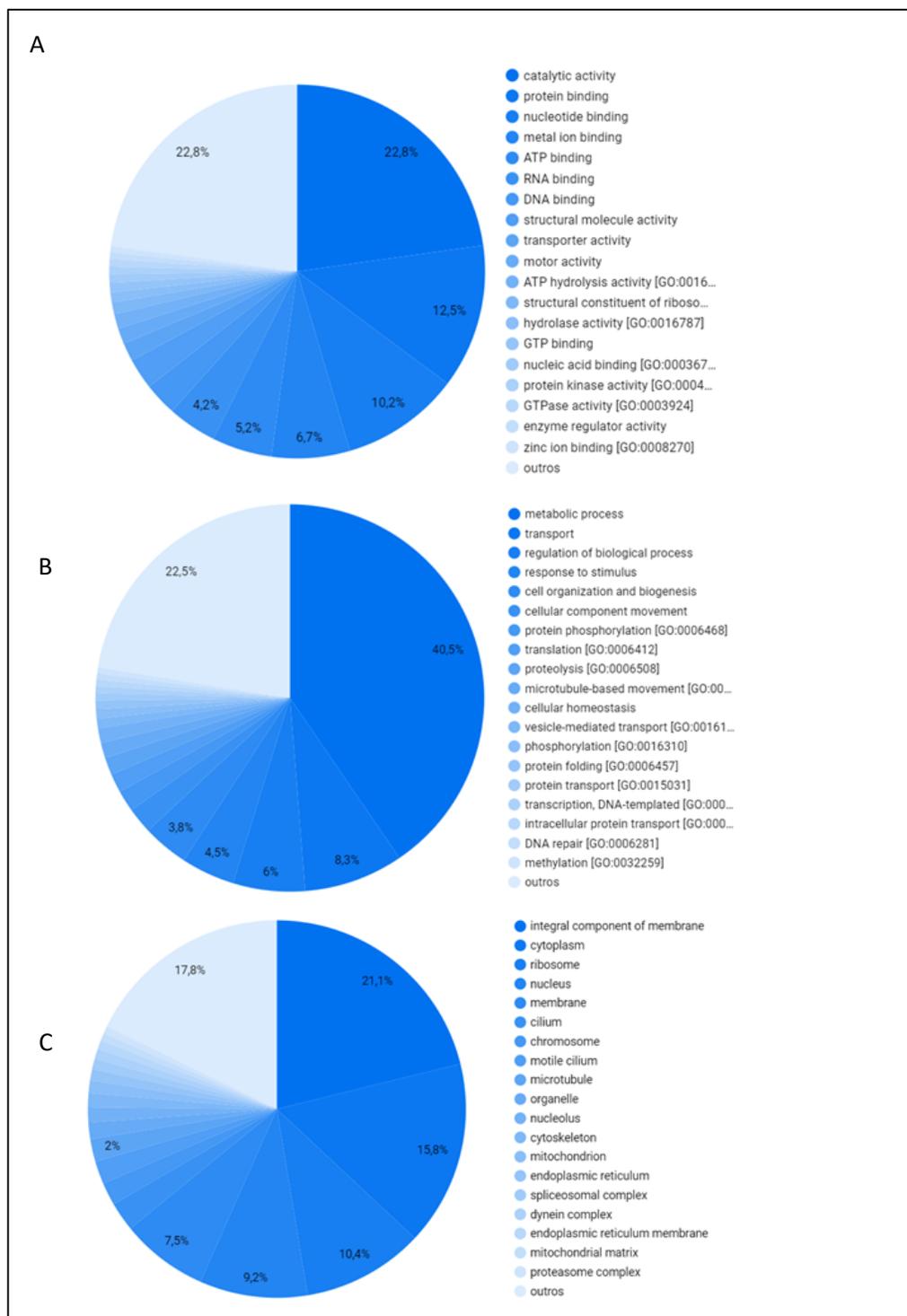


Figura 5. Categorização de Ontologia Gênica (Gene Ontology – GO) das proteínas identificadas. Distribuição de proteínas baseada em funções moleculares (A), processos biológicos (B) e componentes celulares (C) previstos em *L. braziliensis*.

Tabela 2: Categorização funcional baseada na Ontologia Gênica (GO) das proteínas identificadas. Número proteínas pertencentes em categorias classificadas de acordo com as

funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares previstos em *L. braziliensis*. Na tabela estão representadas 15% das categorias com maior representatividade.

Função Molecular		Processo Biológico		Componente Celular	
Categorias	Nº proteínas	Categorias	Nº proteínas	Categorias	Nº proteínas
catalytic activity	710	metabolic process	724	integral component of membrane	195
protein binding	389	transport	148	cytoplasm	146
nucleotide binding	319	regulation of biological process	107	ribosome	96
metal ion binding	210	response to stimulus	80	nucleus	85
ATP binding	161	cell organization and biogenesis	68	membrane	69
RNA binding	132	cellular component movement	39	cilium	23
DNA binding	89	protein phosphorylation	32	motile cilium	18
structural molecule activity	83	translation	28	microtubule	18
transporter activity	50	proteolysis	26	chromosome	18
motor activity	42	microtubule-based movement	23	organelle	13
ATP hydrolysis activity	40	cellular homeostasis	22	nucleolus	12
structural constituent of ribosome	31	vesicle-mediated transport	14	cytoskeleton	11
hydrolase activity	27	phosphorylation	14	mitochondrion	10
GTP binding	26	protein folding	13	endoplasmic reticulum	9
nucleic acid binding	23	protein transport	11	dynein complex	8
GTPase activity	20	intracellular protein transport	10	spliceosomal complex	8
protein kinase activity	20	transcription, DNA-templated	10	endoplasmic reticulum membrane	7
enzyme regulator activity	18	methylation	9	mitochondrial matrix	6

zinc ion binding	17	DNA repair	9	proteasome complex	6
		ubiquitin-dependent protein catabolic process	8		
microtubule binding	16	rRNA	7		
microtubule motor activity	15	processing carbohydrate metabolic process	7		
unfolded protein binding	14	process tricarboxylic acid cycle	7		
calcium ion binding	14	lipid metabolic process	6		
ATP-dependent protein folding chaperone	14	DNA replication	6		
translation initiation factor activity	13	glycolytic process	5		
protein serine/threonine kinase activity	12	RNA processing protein	5		
antioxidant activity	11	peptidyl-prolyl isomerization protein	5		
signal transducer activity	11	deubiquitination	5		
transferase activity metalloendopeptidase activity	11	pseudouridine synthesis	4		
	11	endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport	4		
oxidoreductase activity	10	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	4		
dynein intermediate chain binding	8	ribosome biogenesis	4		
pyridoxal phosphate binding	8	microtubule-based process	4		
4 iron, 4 sulfur cluster binding	8	RNA 3' uridylation	4		
flavin adenine dinucleotide binding	7	cAMP biosynthetic process	4		
DNA-directed 5'-3' RNA polymerase activity	7				

ligase activity	7	cell adhesion	4
		fatty acid biosynthetic process	4
RNA helicase activity minus-end-directed microtubule motor activity	7		
dynein light intermediate chain binding	7		
ABC-type transporter activity	7		
methyltransferase activity	7		
magnesium ion binding	6		
DNA-directed DNA polymerase activity	6		
proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism	6		
myosin phosphatase activity	6		
heme binding	6		
kinase activity	6		

5.6 Quantificação relativa de proteínas das cepas do grupo de lesões atípicas e típicas

A estratégia de marcação isobárica e espectrometria de massa de alta resolução foi realizada para comparar o proteoma de cepas de *L. braziliensis* que causam lesões atípicas (LbLA) e cepas *L. braziliensis* que causam lesões típicas (LbLT).

Para análise quantitativa relativa, foram comparados os valores de abundância das proteínas identificadas em cepas LbLA *versus* LbLT. Nossos resultados mostraram que a abundância de 298 e 234 proteínas estavam significativamente aumentadas e diminuídas, respectivamente, em cepas LbLA em comparação com cepas LbLT (Figura 6A). No entanto, quando consideramos apenas proteínas identificadas em pelo menos

duas das três replicatas independentes, 254 e 196 proteínas tiveram sua abundância aumentada e diminuída, respectivamente (Figuras 6B, C).

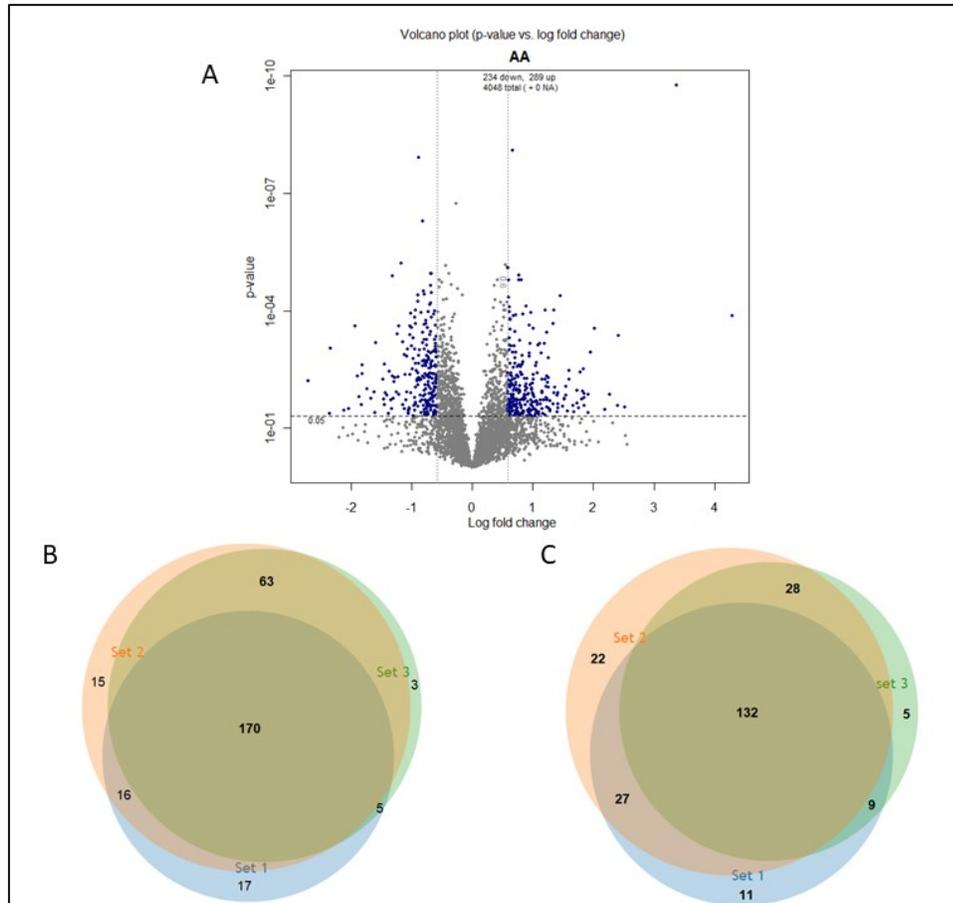


Figura 6. Abundância relativa de proteínas das cepas do grupo de lesões atípicas e típicas. A. *Volcano plot* com a demarcação das proteínas com alterações estatisticamente significativas na abundância (em azul) pelo ANOVA considerando $p < 0,05$ (eixo y) e alteração de *fold change* em log2 de 0,584 (1,5) (eixo x). B. *Overlap* das proteínas positivamente reguladas em cada replicata. C. *Overlap* das proteínas negativamente reguladas em cada replicata.

5.7 Análise de enriquecimento Funcional

Os dados de Gene Ontology (GO) foram usados para obter informações sobre diferenças entre cepas atípicas e típicas de *L. braziliensis*. Com o enriquecimento de GO utilizando as proteínas reguladas, foi possível associar termos GO para 43 proteínas positivamente reguladas e 49 proteínas negativamente reguladas em LbLA comparadas com LbLT . Essas proteínas foram categorizadas em grupos funcionais (Figura 7).

Em relação à Função Molecular (FM), a categoria atividade oxidorreductase, atuando em um grupo de doadores de enxofre ($p= 4,11e-4$) seguido pela atividade do inibidor enzimático ($p= 3,33e-4$) foram significativamente enriquecidos no grupo de proteínas reguladas positivamente. Esses grupos são representados principalmente pelas seguintes proteínas: tripanotiona redutase, peptídeo metionina sulfóxido redutase-*like*, e ecotina. No grupo de proteínas reguladas negativamente, observamos que a atividade da oxidorreductase, atuando no grupo CH-O de doadores ($p= 6,27e-4$), atividade de proteína serina/treonina quinase ($p= 6,45e-4$), atividade de oxidorreductase ($p=7,30e-4$), e atividade oxidorreductase, atuando em um grupo de doadores de enxofre, dissulfeto como acceptor ($p= 1,03e-3$) estavam entre as categorias enriquecidas. Esses grupos são representados principalmente pelas seguintes proteínas: malato desidrogenase e colina desidrogenase (Figura 7A e Tabela 3).

O processo biológico (PB) com significância estatística entre proteínas com maior abundância em cepas atípicas em comparação com cepas típicas foram processo biossintético de composto de nitrogênio celular ($p= 4,68e-5$ com 27 proteínas), processo metabólico peptídico ($p= 1,49e-4$ com 20 proteínas), e processo metabólico da amida ($p=2,42e-4$ com 20 proteínas). Esses grupos são representados principalmente por proteínas ribossomais. Em contraste, nenhuma categoria significativamente enriquecida foi encontrada para proteínas negativamente reguladas (Figura 7B e Tabela 4). Por sua vez, a análise de enriquecimento levando em consideração os componentes celulares, detectou duas categorias dentre as proteínas com aumento de abundância: subunidade ribossomal maior citosólica ($p= 8,19e-4$ com 3 proteínas) e complexo de *prefolding* ($p= 4,68e-5$ com 4 proteínas). Nesses grupos se destacam algumas proteínas hipotéticas (154345556, 154334040, 1691132748, 1691132273), e RNA binding protein-like protein

(Figura 7C e Tabela 5). Dentre as proteínas com diminuição de abundância, 6 categorias foram encontradas: envelope ($p= 2.32e-3$ com 20 proteínas), envelope de organela ($p= 2.32e-3$ com 20 proteínas), membrana de organela ($p= 1.52e-2$ com 20 proteínas), respirassomo ($p= 1.86e-2$ com 5 proteínas), complexo do citocromo ($p= 1.86e-2$ com 5 proteínas), complexo contendo proteína mitocondrial ($p= 4.74e-2$ com 13 proteínas) e fibra de citoesqueleto polimérico ($p= 4.74e-2$ com 6 proteínas). Se destacam as proteínas *kinetoplastid membrane protein-11*, e as proteínas hipotéticas 154343734 e 134065654 (Figura 7C e Tabela 5).

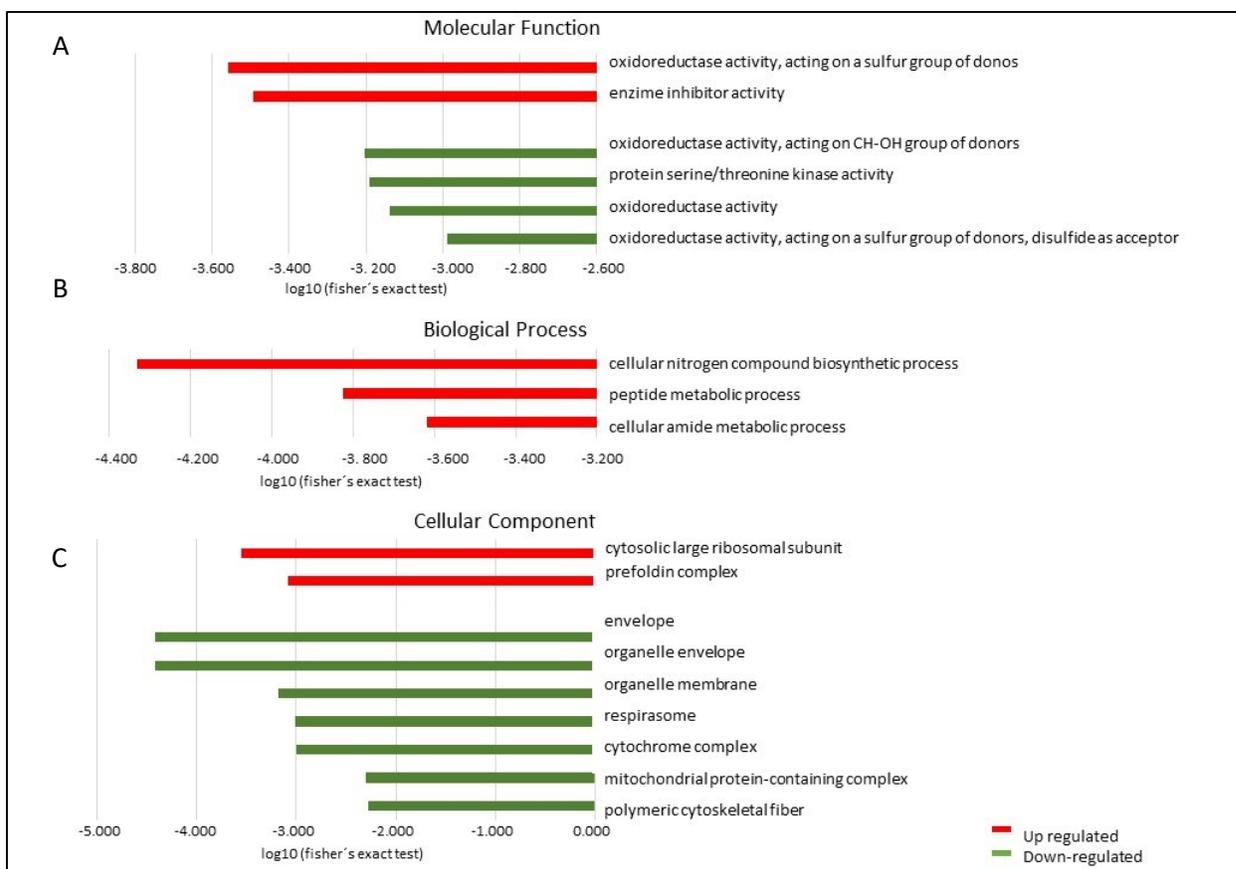


Figura 7. Análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO). Distribuição de proteínas baseada em funções moleculares (A), processos biológicos (B) e componentes celulares (C) previstos em *L. braziliensis* causadoras de lesões atípicas (LbLA) em relação ao grupo de *L. braziliensis* causadoras de lesões típicas (LbLT). Em vermelho, categorias enriquecidas no conjunto de proteínas reguladas positivamente; em verde, categorias enriquecidas no conjunto de proteínas reguladas negativamente. Termos representados por $P < 0,05$ no teste exato de Fisher, filtrando para $FDR < 0,05$.

Tabela 3: Proteínas diferencialmente abundantes mapeadas na análise de enriquecimento de Ontologia Gênica (GO) de Função Molecular. Proteínas classificadas pela razão *L. braziliensis*

causadoras de lesões atípicas (LbLA) em comparação com *L. braziliensis* causadoras de lesões típicas (LbLT) (LbLA/ LbLT). Em negrito proteínas encontradas em mais de um termo.

GO Termo	Fold change (P value)	Proteínas	Razão (Fold change Log2 - LbLA / LbLT)
Proteínas reguladas positivamente			
Oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donos	7,43 (4,11e-4)	trypanothione reductase	
		peptide_methionine sulfoxide reductase-like	2,417
		putative thioredoxin	1,060
		thiol-dependent_reductase_1	0,984 0,709
		putative glutaredoxin-like protein	0,649
Enzyme inhibitor activity	18,26 (3,33e-4)	Ecotin	1,917
		Ecotin-like protein 2	0,797
		Protein phosphatase inhibitor 2 (IPP-2)	0,768
Proteínas reguladas negativamente			
Oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors	7,02 (6,27e-4)	mitochondrial malate dehydrogenase	-1,150
		choline dehydrogenase, like protein	-1,062
		glycosomal malate dehydrogenase	-0,944
		dehydrogenase-like protein	-0,888
		putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0,825
Protein serine/threonine kinase activity	9,70 (6,45e-4)	putative target of rapamycin (TOR) kinase 1	-1,744
		putative protein kinase	-1,029
		protein kinase A catalytic subunit isoform 1	-0,765
		protein kinase A catalytic subunit	-0,676
Oxidoreductase activity	2,73 (7,30e-4)	mitochondrial malate dehydrogenase	-1,150

		choline dehydrogenase, like protein	-1,062
		putative short chain dehydrogenase	-1,017
		conserved hypothetical protein (134065654)	-0,978
		glycosomal malate dehydrogenase	-0,944
		putative endoplasmic reticulum oxidoreductin	-0,938
		dehydrogenase-like protein	-0,888
		putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0,825
		fatty acid desaturase	-0,700
		aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	-0,696
		conserved hypothetical protein (134063632)	-0,662
		putative C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	-0,655
<hr/>			
Oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors, disulfide as acceptor	35,57 (1,03e-3)	putative endoplasmic reticulum oxidoreductin	-0,938
		conserved hypothetical protein (134063632)	-0,662
<hr/>			

Tabela 4: Proteínas diferencialmente abundantes mapeadas na análise de enriquecimento de Ontologia Gênica (GO) de Processo Biológico. Proteínas classificadas pela razão *L. braziliensis* causadoras de lesões atípicas (LbLA) em comparação com *L. braziliensis* causadoras de lesões típicas (LbLT) (LbLA/ LbLT). Em negrito proteínas encontradas em mais de um termo.

GO Termo	Fold change (P value)	Proteínas	Razão (Fold change Log2 - LbLA / LbLT)
Proteínas positivamente reguladas			
Peptide metabolic process and	2,47 (1,49e-4)	putative 60S ribosomal protein L10a	1,807
Cellular amide metabolic process	2,38 (2,42e-4)	40S ribosomal protein S24e	1,398
		60S ribosomal protein L32	1,357
		putative DNA-directed RNA polymerase II FtsJ-like_methyltransferase	1,342
		conserved hypothetical protein putative 60S acidic ribosomal protein	1,119 1,048
		putative 40S ribosomal protein S30	1,041
		conserved hypothetical protein 60S_acidic_ribosomal_protein_P2	0,891 0,816
		acidic ribosomal P2 beta protein	0,769
		putative 60S ribosomal protein L13a	0,712
		thiol-dependent_reductase_1 putative 60S ribosomal protein L19	0,709 0,708
		putative arginyl-tRNA synthetase	0,669
		putative ribosomal protein S7	0,624
		putative asparaginyl-tRNA synthetase	0,623
		putative ribosomal protein I35a	0,616
		putative ribosomal protein L27	0,609
		putative ribosomal protein L15	0,601
putative 60S ribosomal protein L5	0,601		
Cellular nitrogen compound biosynthetic process	2,22 (4,68e-5)	putative 60S ribosomal protein L10a	1,807

40S ribosomal protein S24e	1,398
60S ribosomal protein L32	1,357
putative DNA-directed RNA polymerase II	1,342
FtsJ-like_methyltransferase	1,287
DNA_primase_large_subunit	1,237
Chain B, Dihydroorotate dehydrogenase	1,224
nucleoside diphosphate kinase b	1,072
putative 60S acidic ribosomal protein	1,048
putative 40S ribosomal protein S30	1,041
deoxyribose-phosphate_aldolase	0,969
conserved hypothetical protein	0,954
kynureninase	0,952
conserved hypothetical protein	0,891
60S_acidic_ribosomal_protein_P2	0,816
inosine-guanosine_transporter	0,770
acidic ribosomal P2 beta protein	0,769
putative methylthioadenosine phosphorylase	0,717
putative 60S ribosomal protein L13a	0,712
putative 60S ribosomal protein L19	0,708
putative arginyl-tRNA synthetase	0,669
putative ribosomal protein S7	0,624
putative asparaginyl-tRNA synthetase	0,623
putative ribosomal protein I35a	0,616
putative ribosomal protein L27	0,609
putative ribosomal protein L15	0,601
putative 60S ribosomal protein L5	0,601

Tabela 5: Proteínas diferencialmente abundantes mapeadas na análise de enriquecimento de Ontologia Gênica (GO) de Componente Celular. Proteínas classificadas pela razão L. braziliensis causadoras de lesões atípicas (LbLA) em comparação com L. braziliensis causadoras de lesões típicas (LbLT) (LbLA/ LbLT). Em negrito proteínas encontradas em mais de um termo.

GO Termo	Fold change (P value)	Proteínas	Razão (Fold change Log2 - LbLA / LbLT)
Proteínas positivamente reguladas			
prefoldin complex	14,06 (8,19e-4)	conserved hypothetical protein (154345556)	4,293
		conserved hypothetical protein (154334040)	0,946
		hypothetical protein (1691132748)	0,763
cytosolic large ribosomal subunit	2,22 (4,68e-5)	RNA binding protein-like protein hypothetical_protein (1691132273)	0,781 0,769
		acidic ribosomal P2 beta protein protein phosphatase type 1 regulator-like	0,768 0,632
Proteínas negativamente reguladas			
envelope	2.64 (2.32e-3)	conserved hypothetical protein (154343734)	-1,016
organelle envelope	2.64 (2.32e-3)	conserved hypothetical protein (134065654)	-0,978
organelle membrane	2,21 (1.52e-2)	conserved hypothetical protein (154336277)	-0,977
		GTP-binding protein, putative DREV_methyltransferase	-0,900 -0,866
		cytochrome_c conserved hypothetical protein (134061211)	-0,841 -0,797
		conserved hypothetical protein (154339936)	-0,778
		conserved hypothetical protein (134059324)	-0,754
		conserved hypothetical protein (154344621)	-0,748
		conserved hypothetical protein (154344375)	-0,721
		hypothetical_protein (1527124625)	-0,717
		putative cytochrome c oxidase assembly factor	-0,685

		rieske_iron-sulfur_protein	-0,683
		cytochrome c oxidase subunit IV	-0,628
		conserved hypothetical protein (134065590)	-0,627
		putative ATPase beta subunit	-0,615
		small_nuclear_ribonucleoprotein	-0,607
		conserved hypothetical protein (154340649)	-0,599
		Ras-related_protein_RAB2B	-0,588
respirasome	6.29 (1.86e-2)	cytochrome_c	-0,841
		conserved hypothetical protein (134059324)	-0,754
		conserved hypothetical protein (154344375)	-0,721
		rieske_iron-sulfur_protein	-0,683
		cytochrome c oxidase subunit IV	-0,628
cytochrome complex	13.47 (1.86e-2)	conserved hypothetical protein (134062683)	-1,213
		conserved hypothetical protein (154344375)	-0,721
		rieske_iron-sulfur_protein	-0,683
		cytochrome c oxidase subunit IV	-0,628
		putative protein phosphatase 2A regulatory subunit	-0,586
mitochondrial protein-containing complex	2.25 (4.74e-2)	conserved hypothetical protein (154343734)	-1,016
		conserved hypothetical protein (154336277)	-0,977
		conserved hypothetical protein (134060397)	-0,900
		dehydrogenase-like protein	-0,888
		conserved hypothetical protein (389602236)	-0,781
		conserved hypothetical protein (154339936)	-0,778
		conserved hypothetical protein (154344375)	-0,721
		hypothetical_protein (1527124625)	-0,717
		conserved hypothetical protein (154332161)	-0,689
		putative mitochondrial processing peptidase alpha subunit	-0,682
		conserved hypothetical protein (134063585)	-0,667
		cytochrome c oxidase subunit IV	-0,628
		putative ATPase beta subunit	-0,615

polymeric cytoskeletal fiber	3.70	kinetoplastid membrane protein-11	-2,363
	(4.74e-2)	beta tubulin	-1,937
		beta tubulin	-1,318
		alpha_tubulin	-1,076
		katanin-like protein	-1,048
		alpha_tubulin	-0,675

5.8 Predição de Interação Proteína-Proteína (PPI)

Para identificar possíveis interações entre as proteínas identificadas, uma análise de predição de interações de proteínas foi realizada usando String 11.0 e editadas no Cytoscape 3.4.0. A rede obtida foi composta por 21 proteínas reguladas positivamente e 9 reguladas negativamente. As proteínas reguladas positivamente que interagem umas com as outras, são representadas principalmente por proteínas redutases, e de forma semelhante, as proteínas reguladas negativamente que interagem entre si, foram representadas principalmente por proteínas desidrogenases. Além disso, é possível observar as interações entre as proteínas ribossomais, todas elas reguladas positivamente em cepas isoladas de lesões atípicas em comparação com cepas isoladas de lesões típicas (Figura 8).

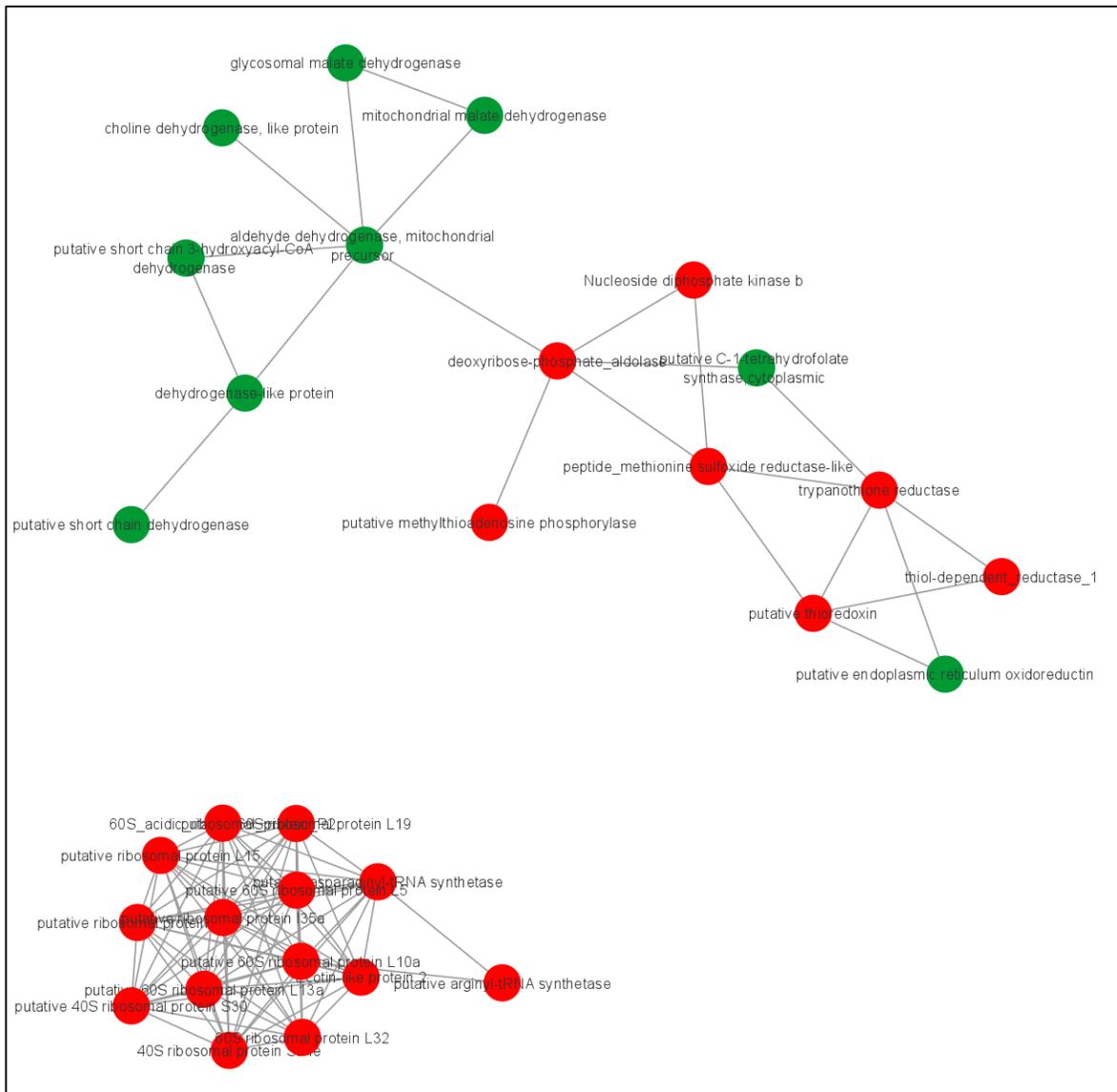


Figura 8. Predição de interação entre proteínas diferencialmente abundantes em *L. braziliensis* que fazem parte das categorias de GO enriquecidas. Vermelho e verde representam proteínas reguladas positivamente e negativamente, respectivamente, na comparação LbLA vs LbLT.

5.9 Análise de enriquecimento de vias metabólicas

A ferramenta KEGG foi usada para identificar as vias mais relevantes associadas às proteínas reguladas nas formas promastigotas de *Leishmania* que causam lesões atípicas. No que diz respeito às proteínas com regulação positiva, a análise mostrou o

enriquecimento de cinco vias: metabolismo de cisteína e metionina ($p=1,58e-4$, com 10 proteínas), metabolismo da glutathiona ($p=5,96e-3$, com 6 proteínas), metabolismo da fenilalanina ($p=6,79e-3$, com 6 proteínas), biossíntese da unidade de açúcar policetídeo ($p=8,46e-3$, com 6 proteínas) e metabolismo da tirosina ($p=9,85e-3$, com 9 proteínas). Em contrapartida, proteínas reguladas negativamente participaram de seis vias: vias de fixação de carbono em procariontes ($p=1,37e-4$, com 8 proteínas); degradação da valina, leucina e isoleucina ($p=4,60e-3$, com 5 proteínas); degradação de benzoato ($p=7,99e-3$, com 5 proteínas); metabolismo do dicarboxilato e glioxilato ($p=8,69e-3$, com 5 proteínas); degradação de geraniol ($p=9,85e-3$, com 3 proteínas); e um pool de carbono por folato ($p=9,85e-3$, com 3 proteínas) (Figura 9). Proteínas pertencentes a cada via estão listadas na Tabela 6, onde se observa que cada proteína participa de mais de uma via exceto no caso do metabolismo da glutathiona. Para verificar as interações entre as proteínas identificadas pertencentes às vias enriquecidas, uma análise de predição de interações de proteínas foi realizada (Figura 10), destacando que as desidrogenases foram regulados negativamente e interagem entre si, e tripanotiona e triparedoxina foram regulados positivamente e interagem uma com a outra.

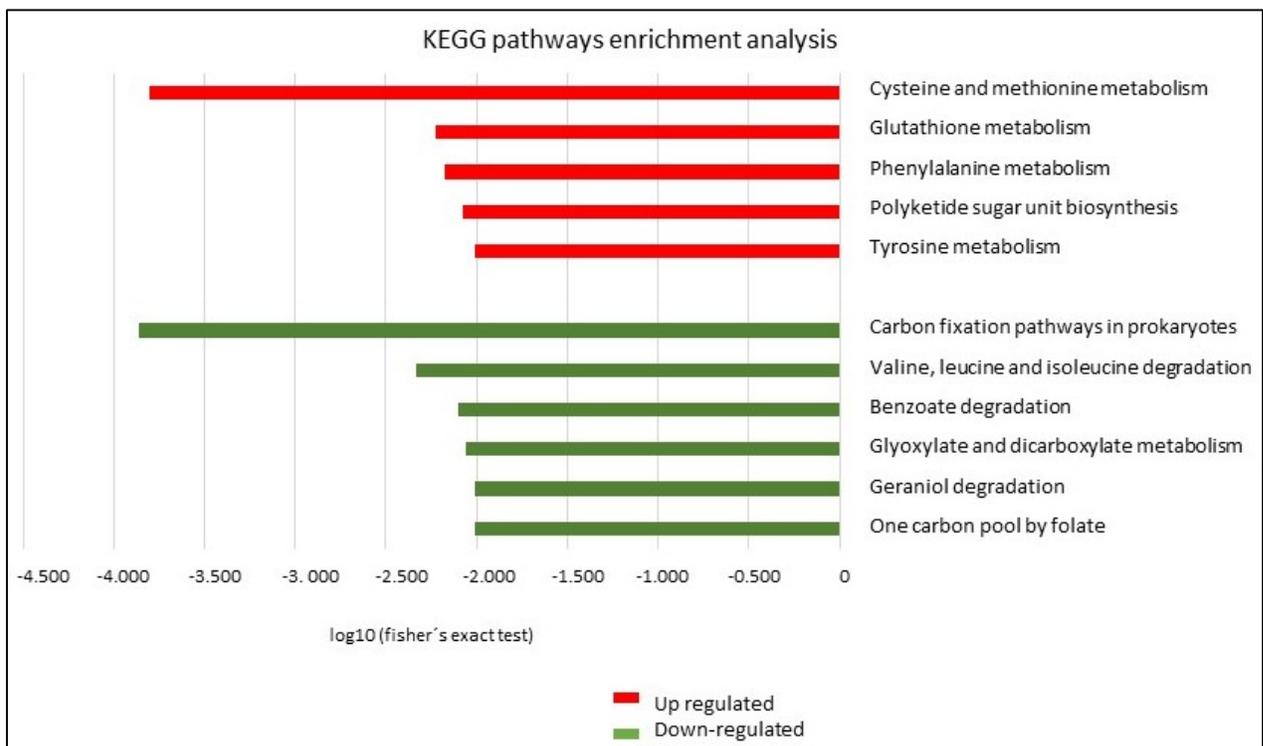


Figura 9. Análise do enriquecimento de vias metabólicas por KEGG. Distribuição de proteínas com base em vias metabólicas em *L. braziliensis* causadoras de lesões atípicas (LbLA) em comparação com *L. braziliensis* causadoras de lesões típicas (LbLT). Em vermelho, vias metabólicas enriquecidas no grupo de proteínas reguladas positivamente; em verde, vias metabólicas enriquecidas no grupo de proteínas reguladas negativamente. Termos representados por $p < 0,01$ no teste exato de Fisher.

Tabela 6: Vias metabólicas por KEGG das proteínas reguladas diferencialmente em *L. braziliensis* causadoras de lesões atípicas (LbLA) em comparação com *L. braziliensis* causadoras de lesões típicas (LbLT). Em negrito, proteínas que estão em mais de uma via.

Vias Metabólicas	PROTEÍNAS	RAZÃO (LbLA / LbLT)
Proteínas reguladas positivamente		
Cysteine and methionine metabolism	putative thymine-7-hydroxylase	1,456
	FtsJ-like_methyltransferase	1,287
	putative sterol 24-c-methyltransferase	0,815
	putative methylthioadenosine phosphorylase	0,717
	conserved hypothetical protein (134063540)	0,686
	putative aspartate aminotransferase	0,679
	putative branched-chain amino acid aminotransferase	0,639
	tyrosine aminotransferase	0,628
	putative arginine N-methyltransferase, type III	0,617
	putative malate dehydrogenase	0,586
Glutathione metabolism	trypanothione reductase	2,417
	hypothetical protein, unknown function (322504762)	1,725
	tryparedoxin_peroxidase	0,994
	thiol-dependent_reductase_1	0,709
	putative trypanothione synthetase	0,690
	putative glutaredoxin-like protein	0,649
Phenylalanine metabolism	FtsJ-like_methyltransferase	1,287
	putative sterol 24-c-methyltransferase	0,815
	conserved hypothetical protein (134063540)	0,686
	putative aspartate aminotransferase	0,679

	tyrosine aminotransferase	0,628
	conserved hypothetical protein (134063845)	0,598
<hr/>		
Polyketide sugar unit biosynthesis	FtsJ-like_methyltransferase	1,287
	putative sterol 24-c-methyltransferase	0,815
	conserved hypothetical protein (134063540)	0,686
	tyrosine aminotransferase	0,628
	putative arginine N-methyltransferase, type III	0,617
	putative lanosterol synthase	0,615
<hr/>		
Tyrosine metabolism	FtsJ-like_methyltransferase	1,287
	putative sterol 24-c-methyltransferase	0,815
	Acyltransferase	0,811
	putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase	0,699
	conserved hypothetical protein (134063540)	0,686
	putative aspartate aminotransferase	0,679
	tyrosine aminotransferase	0,628
	putative arginine N-methyltransferase, type III	0,617
	putative lanosterol synthase	0,615
<hr/>		
Proteínas reguladas negativamente		
<hr/>		
Carbon fixation pathways in prokaryotes	mitochondrial malate dehydrogenase	-1,150
	glycosomal malate dehydrogenase	-0,944
	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0,825
	formate--tetrahydrofolate ligase	-0,819
	methylcrotonoyl-coa carboxylase	-0,683
	biotinylated subunit protein-like protein	-0,655
	putative C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	-0,655
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein, conserved	-0,623
	mitochondrial DNA topoisomerase II	-0,609
<hr/>		
Valine, leucine and isoleucine degradation	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0,825

	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	-0,696
	methylcrotonoyl-coa carboxylase biotinylated subunit protein-like protein	-0,683
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein, conserved	-0,623
	mitochondrial DNA topoisomerase II	-0,609
Benzoate degradation	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0,825
	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	-0,696
	methylcrotonoyl-coa carboxylase biotinylated subunit protein-like protein	-0,683
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein, conserved	-0,623
	mitochondrial DNA topoisomerase II	-0,609
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	mitochondrial malate dehydrogenase	-1,150
	glycosomal malate dehydrogenase	-0,944
	methylcrotonoyl-coa carboxylase biotinylated subunit protein-like protein	-0,683
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein, conserved	-0,623
	mitochondrial DNA topoisomerase II	-0,609
Geraniol degradation	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0,825
	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	-0,696
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein, conserved	-0,623
One carbon pool by folate	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0,825
	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	-0,696
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein, conserved	-0,623

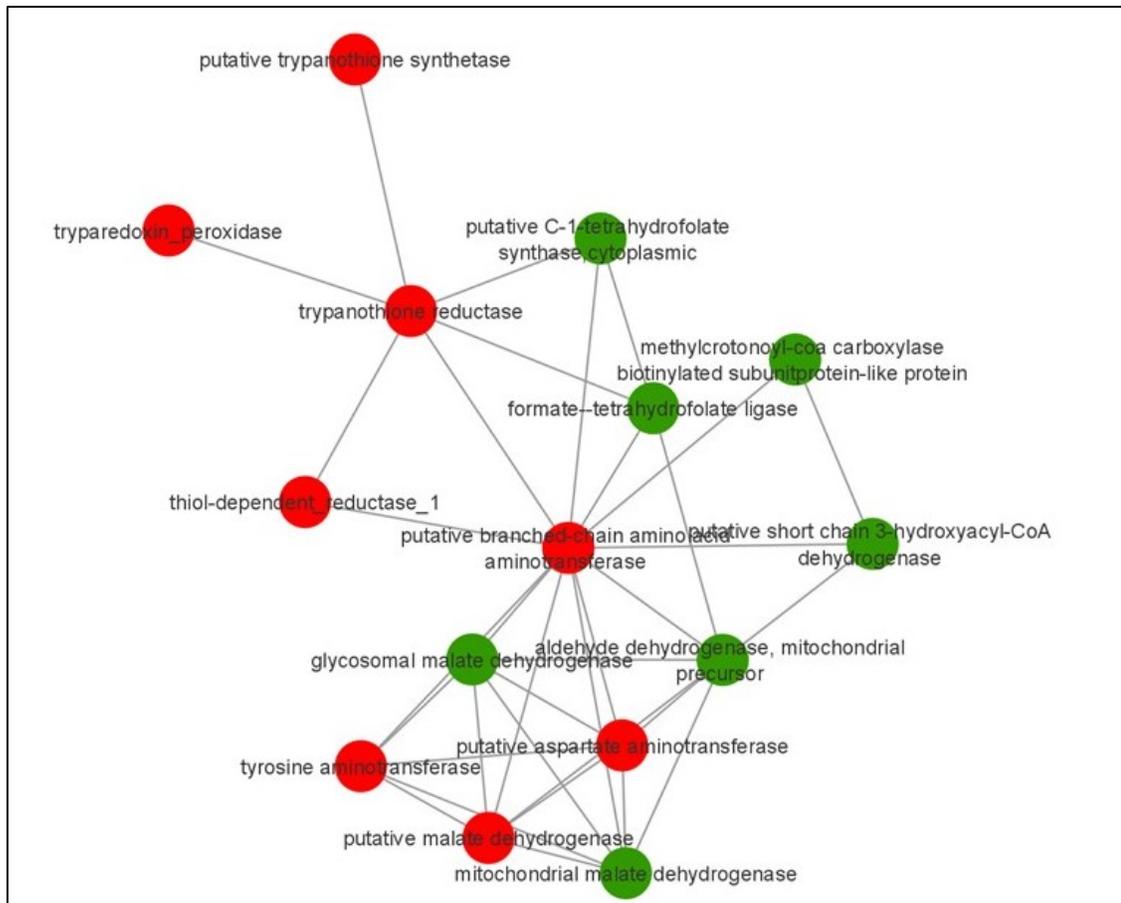


Figura 10: Predição de interação entre proteínas diferencialmente abundantes em *L.(V) braziliensis* que fazem parte de vias metabólicas enriquecidas na análise pelo KEGG. Vermelho e verde representam proteínas reguladas positivamente e negativamente, respectivamente, na comparação LbLA vs LbLT.

5.6 Atividade de peroxidase

A glutathione (GSH) desempenha um papel central na defesa celular contra estresse oxidativo. Nos tripanosomatídeos, a remoção de peróxidos é realizada pela triparedoxina peroxidase (COLOTTI et al. 2013). A triparedoxina peroxidase foi encontrada entre as proteínas pertencentes à via da glutathione (razão LbLA vs. LbLT = 0,994). Portanto, a capacidade antioxidante de diferentes cepas foi avaliada. Após 30 min de exposição a 50 μM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), extratos proteicos de cepas pertencentes ao grupo LbLA consumiram todo o H_2O_2 , e por isso o desvio padrão não pode ser calculado (Figura 11). Já as cepas do grupo LbLT consumiu uma média de 15,7 μM de H_2O_2 . O consumo

de peróxido de hidrogênio no grupo LbLA foi 3,01 vezes maior do que no grupo LbLT ($p < 0,001$; Figura 11).

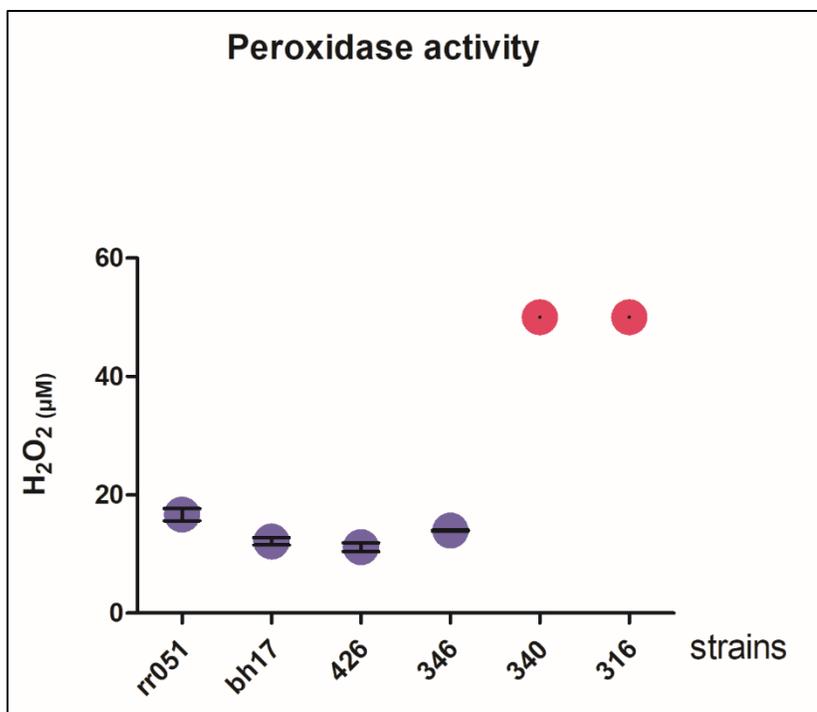


Figura 11. Atividade de peroxidase. Degradação do peróxido de hidrogênio pelos lisados celulares das formas promastigotas de diferentes cepas de *Leishmania braziliensis*. Em azul, grupo típica LbLT e em rosa, grupo atípica LbLA. Esses experimentos foram realizados duas vezes em triplicadas. As dosagens do grupo LbLA excederam o teste (50µM) e, portanto, nenhum desvio padrão pode ser calculado.

Uma vez que o grupo LbLA consumiu todo o peróxido de hidrogênio disponível no intervalo de 30 minutos, nós resolvemos dosar o consumo em tempos menores de incubação. O consumo imediato (tempo de exposição = 10 segundos) dos extratos proteicos de cepas do grupo LbLA foi em média de 21,416 µM de H₂O₂ enquanto que no grupo LbLT foi 14,808 µM de H₂O₂. Após 30 segundos de exposição, LbLA consumiu 41,265 µM de H₂O₂ e LbLT consumiu 18,226 µM de H₂O₂. Em relação ao tempo de 60 segundos, LbLA consumiu 46,288 µM de H₂O₂ e LbLT consumiu 15,117 µM de H₂O₂. Finalmente, no tempo de incubação de 120 segundos o consumo pelos grupos LbLA e LbLT foi de 50 µM e 16,016 µM de H₂O₂ respectivamente. O consumo de peróxido de

hidrogênio no grupo LbLA foi 1,44; 2,27; 3,06 e 3,84 vezes maior do que no grupo LbLT nos tempos 10, 30, 60 e 120 segundos respectivamente ($p < 0,05$; Figura 11).

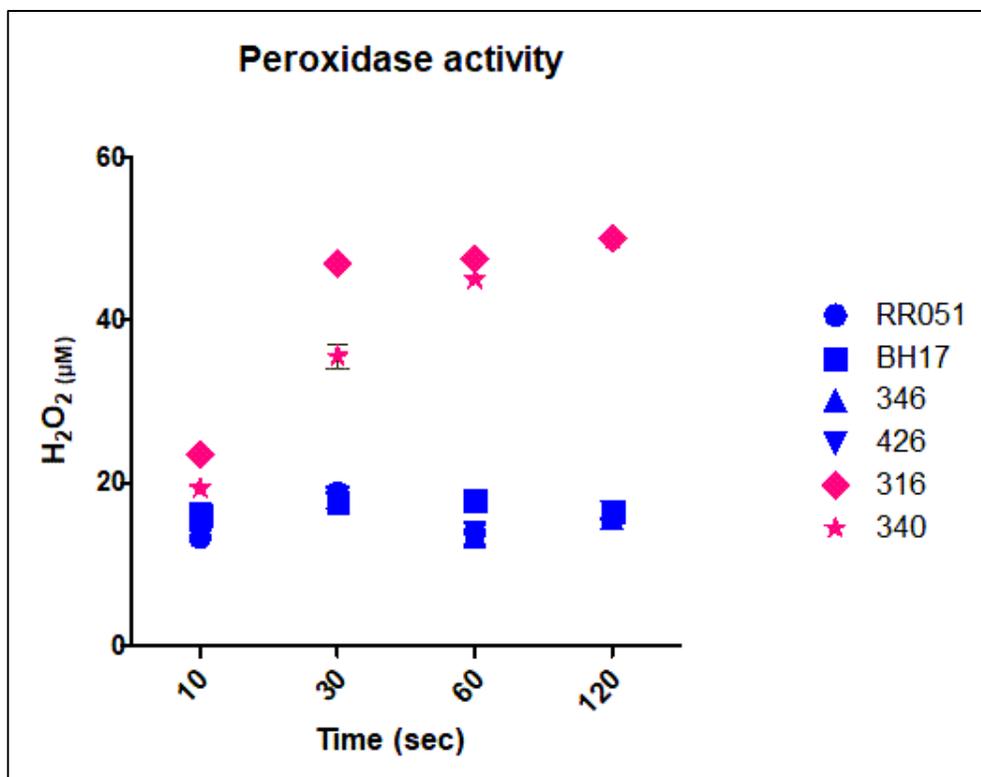


Figura 12. Cinética da atividade peroxidase. Degradação do peróxido de hidrogênio pelos lisados celulares das formas promastigotas de diferentes cepas de *Leishmania braziliensis* nos tempos 10, 30, 60 e 120 segundos. Em azul, grupo típica LbLT e em rosa, grupo atípica LbLA. Esses experimentos foram realizados duas vezes em triplicadas.

6 DISCUSSÃO

Os fatores que determinam a leishmaniose tegumentar atípica, frequentemente causada por *Leishmania (V.) braziliensis*, ainda não são bem compreendidos. É possível que essas formas clínicas sejam determinadas por fatores do hospedeiro e do parasito, como demonstrado para outras formas clínicas de leishmaniose. No entanto, a análise histopatológica de amostras de tecido cutâneo e a expressão de citocinas/quimiocinas em biópsias de pele de pacientes com LTA atípica não mostraram associação com o tipo de lesão (COSTA-SILVA et al., 2014). Em contraste, o parasito apresentou polimorfismo genético correlacionado com manifestações clínicas atípicas (QUARESMA et al., 2018) e foi mais resistente ao antimonato de N-metilglucamina (RUGANI et al., 2019) e ainda casos clínicos têm sido associados a falhas terapêuticas (GUIMARÃES et al., 2016). Assim, realizamos uma análise proteômica comparativa para identificar proteínas diferencialmente abundantes entre cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de lesões atípicas (LbLA) em comparação com isoladas de lesões típicas (LbLT). As cepas utilizadas no presente estudo foram previamente caracterizadas quanto ao polimorfismo genético, bem como quanto à resistência ao antimonato de N-metilglucamina; as cepas típicas são geneticamente não polimórficas e sensíveis ao glucantime, enquanto as cepas atípicas são geneticamente polimórficas e resistentes ao antimonato de N-metilglucamina (RUGANI et al., 2018; QUARESMA et al., 2018).

Uma vez que não está claro o papel do parasito no desdobramento das manifestações clínicas das infecções por *L. braziliensis*, este estudo visa contribuir para o conhecimento dos fatores envolvidos nesse pleomorfismo.

Neste estudo, nós quantificamos 4.048 proteínas, das quais 39% são consideradas proteínas hipotéticas. Os dados que coletamos representam 48,6% do genoma atual, que codifica aproximadamente 8.314 proteínas (PEACOCK et al., 2007). Esses resultados coincidem com a composição do proteoma de *Leishmania spp*, que também é composto por cerca de 40% de proteínas hipotéticas (SANCHIZ et al., 2020). Outros pesquisadores já estudaram o proteoma de diferentes espécies de *Leishmania*. Nirujogi e colaboradores (2014) identificaram 3.386 proteínas em *L. donovani* nos estágios de promastigotas e amastigotas usando digestão com tripsina em gel, seguida por cromatografia de troca

catiônica forte (SCX) e analisadas por LC–MS/MS usando o espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap Velos ETD. Também em 2014, Pawar et al. identificaram 3.613 proteínas no estágio promastigota de *L. major* utilizando da mesma metodologia. Já para promastigotas de *L. infantum*, Sanchiz et al. (2020) identificaram 2.352 proteínas que foram analisadas por RP-LC-MS/MS em um sistema Easy-nLC II acoplado a um espectrômetro de massa híbrido LTQ-Orbitrap-Velos-Pro. O número de proteínas que identificamos neste estudo é expressivo e demonstra a eficiência da abordagem proteômica utilizada em comparação com estudos anteriores.

A análise proteômica comparativa revelou 254 e 196 proteínas com abundância aumentada e diminuída, respectivamente, em linhagens atípicas em comparação com linhagens típicas e presentes em pelo menos dois sets. Para identificar potenciais fatores relacionados a cada cepa, as proteínas foram categorizadas em grupos funcionais com base na função molecular (FM), no processo biológico (PB) e nos componentes celulares (CC), seguido de análise de predição de interações proteicas (PPI), bem como análise de enriquecimento de via metabólica usando a ferramenta KEGG. Os dados apontaram atividade redox regulada positivamente na cepa atípica, entre outros, e o teste de atividade peroxidase validou os achados.

Dentro do hospedeiro mamífero, o parasito *Leishmania* vive no ambiente enzimático letal das células do sistema mononuclear fagocitário, onde lidam com o estresse oxidativo gerado por estas células para que elas sobrevivam. A sobrevivência do parasito é atribuída a um metabolismo redox único com o qual o parasito evoluiu. No presente estudo, a atividade oxidoreductase de proteínas que atuam em doadores de grupos de enxofre foi regulada positivamente em cepas atípicas em comparação com cepas típicas. Nossos resultados mostram que neste processo cinco proteínas foram aumentadas, representadas principalmente pela tripanotiona redutase (TR), com maior razão positiva (2,42) seguida pelo peptídeo metionina sulfóxido redutase-like (Msr) (razão =1,06). Tanto TR quanto Msr são proteínas que catalisam reações de redução e contribuem para as defesas antioxidantes desses parasitos. A TR é uma enzima encontrada nos tripanossomatídeos, equivalente à glutathiona redutase (MITTAL et al., 2005; COLOTTI et al., 2013). A TR neutraliza o peróxido de hidrogênio produzido pelos macrófagos durante

a infecção por meio do sistema triparedoxina/triparedoxina peroxidase I (TXN/TXNPx) (COLOTTI et al., 2013). Portanto, a inibição do TR aumenta os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio que são letais ao parasito. Da mesma forma, Msr é uma proteína que catalisa a reação de redução, neste caso, reduzindo os resíduos de metionina oxidada. Rodríguez-Veja et al. (2021) mostraram que cepas de *L. braziliensis* relacionados à leishmaniose disseminada (LD) também podem ter uma maior resistência ao estresse oxidativo, mediado pelo aumento da abundância das proteínas tripanotiona redutase e tioredoxina. Consistentemente, a interrupção do gene da tripanotiona redutase diminui a infectividade da *Leishmania* e sua capacidade de sobreviver dentro do macrófago. Assim, nossos resultados indicam que os parasitos causadores de lesões atípicas apresentam maior abundância de algumas proteínas relacionadas à homeostase redox, o que pode conferir maior sobrevivência no interior dos macrófagos.

Os compostos contendo antimônio pentavalente (estibogluconato de sódio Pentostam® e N-metil-glucamina Glucantime®) têm sido os medicamentos de primeira linha para o tratamento de todas as formas clínicas de leishmaniose desde 1940 (DAVIDSON, 1999) e, como nenhuma vacina humana está disponível para uso clínico, a quimioterapia com antimônio pentavalente ainda é o controle mais importante para a leishmaniose. O mecanismo de ação do antimônio não foi totalmente elucidado; no entanto, acredita-se que SbIII (stibogluconato) gere distúrbios no potencial tiol redox do parasito, induzindo o efluxo de tióis intracelulares e inibindo a tripanotiona redutase, resultando em morte celular por estresse oxidativo (WYLLIE et al., 2004). O teste de suscetibilidade ao antimônio (ensaio EC 50) revelou que as linhagens de *L. braziliensis* superexpressando a triparedoxina peroxidase citosólica (cTXNPx) tiveram um aumento de 2 vezes na resistência a SbIII em comparação com a linha parental não transfectada. Além disso, esses clones foram mais tolerantes ao H₂O₂ exógeno do que a linha parental não transfectada (MOREIRA & MURTA, 2016). Da mesma forma, a superexpressão de nucleosídeo difosfato quinase b e fator de alongamento 2 resulta em um aumento na resistência SbIII em *L. braziliensis* (ANDRADE & MURTA, 2014). Corroborando com os dados da literatura, os resultados do presente trabalho, no qual utilizamos cepas naturalmente resistentes ao antimônio que causam leishmaniose tegumentar atípica, mostraram que essas cepas apresentam proteínas com funções redutases reguladas

positivamente (triptofano redutase, tioredoxina, peptídeo metionina sulfóxido redutase-like, tiol-dependente redutase 1, nucleosídeo difosfato quinase b, desoxirribose fosfato aldolase e metiltioadenosina fosforilase, que interagem entre si (Figura 8). Algumas dessas proteínas também participam do metabolismo da glutatona (uma das vias de enriquecimento mostradas pela ferramenta KEGG). As cepas mostraram atividade de peroxidase 3,01 vezes maior do que as típicas no tempo de incubação de 30 minutos ($P < 0,001$, figura 11). Como já mencionado, as cepas atípicas utilizadas no presente estudo foram previamente caracterizadas como resistentes ao antimonato de N-metilglucamina (RUGANI et al., 2018), então, acreditamos que, coletivamente, foi possível identificar as proteínas relacionadas à resistência ao antimônio e provar a maior atividade da peroxidase nas cepas do grupo LbLT. Esses dados lançam nova luz sobre os casos de LTA atípicos que têm sido associados a falhas terapêuticas.

Portanto, em relação às categorias de funções moleculares, observamos enriquecimento de “Atividade inibidora da enzima” como termos regulados positivamente em cepas atípicas, incluindo as proteínas ecotina, ecotina-like e inibidor de proteína fosfatase 2 (IPP-2). A ecotina é um inibidor de serina protease produzido por centenas de espécies microbianas, bem como alguns patógenos como *Leishmania spp.* Os parasitos codificam inibidores da serina protease (ISP), que realizam a inibição das serina proteases do sistema de resposta imune e manipulam os processos fisiológicos do hospedeiro para garantir sua sobrevivência. Em *L. major*, o ISP tem como alvo as serina peptidases do hospedeiro e influencia os estágios iniciais da infecção do hospedeiro mamífero (ESCHENLAUER et al., 2009). Alam et al. (2016) identificou, purificou e caracterizou uma ISP endógena de uma cepa indiana de *L. donovani*, que causa leishmaniose visceral fatal, e esses inibidores mostram eficácias variadas e totalmente contrastantes em relação às serina proteases próprias, bem como de organismos superiores. Para os autores, isso indica que ele acelera a progressão da doença e impulsiona a sobrevivência do parasito ao inibir as atividades das serina proteases do hospedeiro. Posteriormente, foi demonstrado que a ecotina bloqueia a ativação da via da lectina do complemento por meio da inibição de suas principais enzimas ativadoras, MASP-1 e MASP-2. Além disso, ao inibir a MASP-3, a ecotina também interrompe a ligação fundamental entre a lectina e as vias alternativas. Assim, a ecotina é uma ferramenta de autodefesa potente e versátil

que bloqueia múltiplas atividades antimicrobianas no soro. Essas descobertas sugerem que a ecotina pode ser um alvo relevante de drogas antimicrobianas (NAGY et al., 2019). Assim, nossos dados sugerem que a ecotina pode ser um novo alvo de fármaco a ser testado em cepas resistentes ao antimônio, conforme já mencionado. Nossos dados também mostraram regulação positiva do inibidor da proteína fosfatase 2 (IPP-2). A fosforilação e a desfosforilação de proteínas são bem reconhecidas como processos importantes que regulam múltiplos mecanismos fisiológicos. Até o momento, não há relatos de IPP-2 de *Leishmania*; entretanto, é uma proteína envolvida na regulação de fosfoproteínas e na regulação da transdução de sinal capaz de impedir a atividade de uma proteína fosfatases, enzimas que hidrolisam grupos fosfato de proteínas fosforiladas. A regulação positiva dos inibidores da fosfatase, conseqüentemente, permite maior atividade de proteínas fosforiladas, que estão associadas a diversas funções celulares, incluindo glicólise, motilidade, mitose, apoptose, progressão do ciclo celular e transdução de sinal (QURESHI et al., 2019).

Um agrupamento de várias proteínas ribossômicas interagindo entre si foi observado com enriquecimento de processos biológicos. São o total de 12 (de 27) proteínas ribossômicas, das quais 9 interagem entre si e todas são reguladas positivamente em cepas de lesões atípicas. Os ribossomos eucarióticos possuem aproximadamente 70 proteínas, das quais 30 estão presentes na subunidade menor e 40 na subunidade maior (TSURUGI et al., 1978), sugerindo, portanto, que 12 proteínas reguladas podem não estar relacionadas ao aumento da atividade ribossômica. No entanto, em *Leishmania* spp., as proteínas relacionadas ao ribossomo têm sido consideradas moléculas relevantes durante a infecção e demonstraram modular a atividade celular e a liberação de citocinas (CORDEIRO-DA-SILVA et al., 2001). Portanto, são bons candidatos à vacinação (IBORRA et al., 2008; BRITO et al., 2017). Essas proteínas ribossômicas poderiam estar associadas à modulação da resposta imune, favorável aos parasitos de linhagens atípicas cuja duração da doença foi significativamente maior entre os indivíduos com LTA conforme relatado em Guimarães et al. (2016).

Nossos resultados também demonstram regulação negativa da atividade da oxidorreductase, atuando no grupo de doadores CH-OH, bem como atuando em um grupo

de doadores de enxofre, dissulfeto como aceptor, grupos representados principalmente por malato desidrogenase e colina desidrogenase em cepas atípicas em comparação com cepas típicas. Nesse caso, as razões negativas mais significativas foram malato desidrogenase (-1,15) e colina desidrogenase (-1,06). Além disso, essas categorias incluíam várias desidrogenases reguladas negativamente (malato desidrogenase, colina desidrogenase, proteína semelhante à desidrogenase, 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia curta e aldeído desidrogenase) que interagem umas com as outras (Figura 8). As desidrogenases são enzimas oxidoreduções que catalisam a transferência de hidrogênio e um par de elétrons de um substrato reduzido, que é oxidado na reação, para uma molécula receptora de elétrons, que por sua vez, é reduzida. Em eucariotos superiores, o MDH mitocondrial (mMDH) está envolvido na transferência de equivalentes redutores do citosol para a mitocôndria, o que é essencial para a atividade da via glicolítica no citosol. A MDH foi demonstrada na *Leishmania* há mais de 20 anos (MOTTRAM & COOMBS, 1985), embora os papéis metabólicos das isoenzimas da MDH nos tripanossomatídeos ainda não tenham sido claramente estabelecidos. Leroux et al. (2006) demonstraram a presença de três proteoformas de MDH com propriedades bioquímicas ligeiramente distintas e diferentes localizações subcelulares (mitocondrial e citosólica) em *Leishmania* spp., e verificaram que essas isoenzimas são notavelmente mais abundantes em amastigotas do que em promastigotas de *L. mexicana*. Esses autores presumiram que as características funcionais e bioquímicas dessas isoenzimas refletem a adaptação metabólica às diferentes fontes de nutrientes que esses parasitos têm de enfrentar durante seu ciclo de vida. Em *L. braziliensis*, MDH foi inferido por homologia, entretanto, em consonância com o presente trabalho, o estudo de Rezende et al. (2017) encontraram MDH em *L. amazonensis*. Da mesma forma, a presença de colina desidrogenase em *Leishmania* spp. foi inferido por homologia. Assim, até o momento, não há relatos de dados de atividade experimental envolvendo malato desidrogenase e colina desidrogenase em *Leishmania* spp., podendo-se especular sobre o papel dessas enzimas em relação às cepas estudadas no presente trabalho.

Outra regulação negativa observada em cepas atípicas foi relacionada à atividade serina/treonina quinase pelas proteínas-alvo putativas da rapamicina (TOR) e proteína quinase 1 quinase. Inicialmente, os TORs foram identificados por mutações que conferem

resistência a um potente metabólito antifúngico chamado rapamicina (HEITMAN et al., 1991). As quinases TOR são os principais reguladores mestres em eucariotos, ligando as condições ambientais, como a disponibilidade de nutrientes e estímulos, à síntese de proteínas e à maquinaria do ciclo celular para coordenar o crescimento e a replicação celular. Os parasitos *Leishmania* TOR mutantes foram incapazes de sobreviver ou replicar em macrófagos *in vitro* ou de induzir patologia ou estabelecer infecções em camundongos *in vivo*. A perda de virulência está associada a um defeito na formação do acidocalcissoma, uma organela única dos protozoários que desempenha um papel importante no metabolismo energético (MADEIRA DA SILVA & BEVERLEY, 2010). Com base nesses dados, a regulação negativa de TOR em cepas atípicas poderia conferir menor virulência a essa cepa em comparação com cepas típicas; no entanto, apenas uma proteína não é suficiente para determinar a virulência. Assim, não podemos inferir o papel da regulação dessa proteína nas cepas estudadas. Da mesma forma, a regulação negativa da proteína quinase 1 sozinha é muito difícil de especular pois pertence a uma importante família de proteínas. Vários estudos exploraram o papel individual proteínas quinases na sobrevivência de promastigotas de *Leishmania*, diferenciação metacíclica e replicação de amastigotas, bem como seu papel na infectividade. Baker e colaboradores (2021) identificaram reguladores de diferenciação ou sobrevivência em uma análise funcional sistemática de proteínas quinases de *Leishmania*. Eles aplicaram deleção de genes em todo o quinoma em promastigotas de *L. mexicana* para definir proteínas quinases com funções de transição do ciclo de vida. Enquanto 162 genes são dispensáveis, 44 genes de proteínas quinases são refratários à deleção em promastigotas e são prováveis genes centrais necessários para a replicação do parasito. Portanto, para entender o papel dessa função molecular e suas proteínas com diminuição de abundância, são necessários mais estudos nas cepas utilizadas no presente trabalho.

Em relação às proteínas pertencentes aos componentes celulares enriquecidos, observamos que cerca de metade das proteínas (48,2%) encontradas são anotadas como hipotéticas, o que limita a nossa especulação sobre o papel destas com o fenótipo observado. No entanto entre as proteínas com diminuição de abundância encontramos GTP *binding* (-0,977), citocromo C (-0,841) e citocromo C oxidase subunidade IV (-0,628)

fazendo parte dos componentes celulares enriquecidos como envelope e membrana de organelas.

As proteínas de ligação guanosina-5'-trifosfato (*GTP-binding*) interagem com a molécula de guanosina trifosfato (GTP) para executar diversas funções biológicas. Elas são encontradas em todos os tipos de células e são altamente conservadas na evolução, indicando que são importantes para a sobrevivência dos organismos. Em *Leishmania* spp as proteínas *GTP-binding* têm sido relacionadas com as vias de secreção do parasita em resposta ao ambiente e sua comunicação com a célula hospedeira durante a infecção ativa (ALVES-FERREIRA et al. 2015). Além disso, as proteínas *GTP-binding* em *Leishmania* estão sendo investigadas como possíveis alvos para imunoterapia, uma vez que essas proteínas podem desempenhar um papel na resposta imunológica do hospedeiro. Estudos têm mostrado que a vacinação com proteínas *GTP-binding* pode induzir uma resposta imune protetora contra a infecção por *Leishmania infantum* (LAGE et al. 2022).

O mesmo acontece com as proteínas citocromo C e citocromo C oxidase subunidade IV. O citocromo c é uma proteína importante na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, que desempenha um papel crucial na geração de energia celular em muitos organismos, incluindo *Leishmania*. Essa proteína é codificada por um gene do mesmo nome, e sua sequência de aminoácidos é altamente conservada entre as espécies.

Em *Leishmania*, o citocromo c é essencial para a sobrevivência e proliferação do parasito (SHAHEEN et al. 2021; CARDENAS et al. 2015). Esta proteína faz parte do complexo enzimático localizado na membrana mitocondrial interna de células eucarióticas sendo um constituinte terminal chave das cadeias de transporte de elétrons necessárias para gerar um potencial de membrana mitocondrial para a síntese de trifosfato de adenosina (ATP). Estudos anteriores mostraram que a diminuição da expressão do gene do citocromo c em *Leishmania major* resultou em diminuição da viabilidade celular, função mitocondrial defeituosa a 35 °C, parasitismo macrófago diminuído e termossensibilidade (CARDENAS et al. 2015). Em outro estudo a deleção do gene responsável pela transcrição do componente Ldp27 que faz parte do complexo Citocromo

C Oxidase em *L. donovani*, gerou parasitos com virulência diminuída em experimentos *in vitro* e *in vivo* (DEY et al. 2010).

Uma vez que a menor abundância das proteínas GTP-*binding* e citocromo C é observado nas cepas atípicas, presume-se que o aumento de abundância das proteínas de oxirredução encontradas nos processos biológicos e funções moleculares enriquecidas seja efetivamente responsável pelos fenótipos observados nessas cepas atípicas.

Os resultados aqui apresentados mostram que a comparação entre cepas atípicas e típicas de *L. braziliensis* permitiu a identificação reprodutível de várias proteínas que distinguem os dois grupos. De maneira geral, cepas isoladas de formas atípicas apresentaram aumento de abundância de proteínas que podem conferir maior sobrevivência dentro de macrófagos, proteínas que influenciam os estágios iniciais da infecção do hospedeiro mamífero e proteínas associadas à resistência à terapia antimonial. Além disso, a atividade da peroxidase foi 3,01 vezes maior nas cepas atípicas do que nas cepas típicas.

7 CONCLUSÕES

O nosso estudo identificou um total de 4.048 proteínas que representam cerca de 48% do genoma de *L. braziliensis*. Com isso, fornecemos o proteoma mais completo e experimentalmente comprovado até o momento para essa espécie. Esse resultado é um passo significativo na compreensão da biologia molecular de *L. braziliensis*.

Ao comparar proteínas presentes em promastigotas de cepas de *L. braziliensis* isoladas de lesões atípicas e típicas, encontramos diferenças significativas em suas abundâncias. A análise dessas cepas permitiu a identificação reprodutível de várias proteínas que distinguem os dois grupos. Isso pode levar a novas estratégias para o tratamento de diferentes tipos de lesões causadas por *L. braziliensis*.

Ao analisar cepas isoladas de *L. braziliensis* causadoras de lesões atípicas, notamos uma regulação positiva de proteínas que podem conferir maior sobrevivência dentro de macrófagos. Além disso, identificamos proteínas que influenciam os estágios iniciais da infecção do hospedeiro mamífero e proteínas associadas à resistência à terapia com antimônio. Esses achados sugerem que as cepas causadoras de lesões atípicas podem ter vantagens adaptativas em relação às cepas causadoras de lesões típicas.

Por fim, descobrimos que as cepas causadoras de lesões atípicas apresentam atividade da peroxidase 3,01 vezes maior do que nas cepas causadoras de lesões típicas. Essa descoberta pode contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes às diferentes apresentações clínicas de *L. braziliensis*.

Os dados gerados até o momento foram publicados (anexo) e se encontram na seguinte referência: Esteves BB, Melo-Braga MN, Gorshkov V, Verano-Braga T, Larsen MR, Gontijo CMF, Quaresma PF, Andrade HM. 2022. Characterization of Differentially Abundant Proteins Among *Leishmania (Viannia) braziliensis* Strains Isolated From Atypical or Typical Lesions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 12: 2235-2988. DOI:10.3389/fcimb.2022.824968.

REFERÊNCIAS

- Adriano AL, Leal PAB, Breckenfeld MP et al. 2013. American tegumentary leishmaniasis: an uncommon clinical and histopathological presentation. *An Bras Dermatol* 88:260–262.
- Aït-Oudhia, K., Gazanion, E., Vergnes, B. et al. 2011. *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol Res* 109, 1225–1232.
- Akhoundi M, et al. 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10 (3):1–40.
- Akilov OE, Khachemoune A, Hasan T. 2007. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis *Int. J. Dermatol.*, 46: 132-142.
- Alam MN, Das P, De T, Chakraborti T. 2016. Identification and Characterization of a *Leishmania Donovanii* Serine Protease Inhibitor: Possible Role in Regulation of Host Serine Proteases. *Life Sci.* 144, 218–225.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7 (5): e35671.
- Alves-Ferreira EV, Toledo JS, De Oliveira AH, Ferreira TR, Ruy PC, et al. 2015. Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal *Leishmania braziliensis* Isolates from the Same Patient. *PLoS Negl Trop Dis.* Sep 14;9(9):e0004018.
- Andrade, J. M., Murta, S. M. 2014. Functional Analysis of Cytosolic Tryparedoxin Peroxidase in Antimony-Resistant and -Susceptible *Leishmania Braziliensis* and *Leishmania Infantum* Lines. *Parasit. Vectors* 7, 406.
- Andrade-Narvaez FJ, et al. 2016. Asymptomatic infection with American cutaneous leishmaniasis: Epidemiological and immunological studies. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* (111) 10:599–604.
- Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH, 2017 Proteomics: Technologies and Their Applications, *Journal of Chromatographic Science* 55:182–196.
- Baker, N., Catta-Preta, C. M. C., Neish, R., Sadlova, J., Powell, B., Alves-Ferreira, E. V. C., et al. 2021. Systematic Functional Analysis of *Leishmania* Protein Kinases Identifies Regulators of Differentiation or Survival. *Nat. Commun.* 12 (1), 1244.
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceição-Silva F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS. 2009. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Experimental Parasitology*; 121:317-322.

Barabasi AL, Oltvai ZN. 2004. Network biology: understanding the cell's functional organization, *Nat Rev Genet*, vol. 5 (pg. 111-3).

Barbosa EB. et al. 2012. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 58: 366–375.

Bari AU and Rahman SB, 2008. Rahman Many faces of cutaneous leishmaniasis Indian *J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 74: 23-27.

Basano SA, Camargo LMA. 2004 Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. bras. epidemiol.* 7: 328-337.

Bates PA. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 37(10):1097-106.

Brilhante JA, Oliveira IVP, Ymakawa AC et al. 2019. Serological and molecular investigation of *Leishmania* spp. infection in cats from an area endemic for canine and human leishmaniasis in Northeast Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal, v. 28, n. 4, p. 790-796.

Brito, R. C., Guimarães, F. G., Velloso, J. P., Corrêa-Oliveira, R., Rui, J. C., Reis, A. B., et al. 2017. Immunoinformatics Features Linked to *Leishmania* Vaccine Development: Data Integration of Experimental and In Silico Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2), 371.

Buates, S, Matlashewski, G. 2001. General Suppression of Macrophage Gene Expression During *Leishmania donovani* Infection. *The Journal of Immunology*, v. 166, n. 5, p. 3416–3422.

Burza S, Croft SL, Boelaert M. 2018. Leishmaniasis. *The Lancet.* 392: 951-970.

Calvopina M, Gomez EA, Uezato H, Kato H, Nonaka S, and Hashiguchi Y. 2005. Atypical Clinical Variants in New World Cutaneous Leishmaniasis: Disseminated, Erysipeloid, and Recidiva Cutis Due to *Leishmania (V.) Panamensis*. *Am. J Trop. Med. Hyg* 73:281–284.

Cardenas D, Carter PM, Nation CS, Pizarro JC, J. Guidry, Aiyar A, et al. 2015. LACK, a RACK1 ortholog, facilitates cytochrome c oxidase subunit expression to promote *Leishmania major* fitness. *Mol. Microbiol.* 96: 95 – 109.

Carnielli JB, Andrade HM, Pires, S.F.; et al. 2014. Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant *Leishmania infantum chagasi* isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes. *J Proteomics.* v.108, p.198-208.

Ceyhan AM, Yildirim M, Basak PY, Akkaya VB, Erturan I. 2008. A case of erysipeloid cutaneous leishmaniasis: atypical and unusual clinical variant Am. J. Trop. Med. Hyg., 78: 406-408.

Chaussabel D. et al. 2003. Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. v. 102, n. 2, p. 672–681.

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

Colotti G, Baiocco P, Fiorillo A, Boffi A, Poser E, Chiaro FD, et al. 2013. Structural Insights Into the Enzymes of the Trypanothione Pathway: Targets for Antileishmaniasis Drugs. Future Med. Chem. 5:1861–1875.

Cordeiro-Da-Silva, A, Borges, M. C, Guilvard, E, Ouaiissi, A 2001. Dual Role of the *Leishmania Major* Ribosomal Protein S3a Homologue in Regulation of T- and B-Cell Activation. Infect. Immun. 69 (11), 6588–6596.

Costa MM, Andrade HM, Bartholomeu DC, Pires SF; Chapeaurouge Ad, Gazzinelli RT. 2011. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D Difference Gel Eletrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: Identification of Novel Candidate Antigens for Diagnostic Tests and Vaccine. J. Proteome Res. V.10, p.2172–2184.

Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhaes AV, Barreto AC. 1986. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. J. Trop. Med. Hyg. 89: 319–323.

Costa-Silva MF, Gomes LI, Martins-Filho OA, Rodrigues-Silva R, de Moura Freire J, Quaresma PF, et al. 2014. Gene Expression Profile of Cytokines and Chemokines in Skin Lesions From Brazilian Indians With Localized Cutaneous Leishmaniasis. Mol. Immunol. 57:2:74–85.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr. and Momen H 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 50:296–311.

Da-Cruz AM, Filgueiras DV, Coutinho Z, Mayrink W, Grimaldi G Jr, De Luca PM, et al. 1999. Atypical Mucocutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania Braziliensis* in an Acquired Immunodeficiency Syndrome Patient: T-Cell Responses and Remission of Lesions Associated With Antigen Immunotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz; 94: 537–542.

Da Silva GA, Sugui D, Nunes RF, Azevedo K, Azevedo M, Marques A, Martins, C, Ferry FR. 2014. Mucocutaneous leishmaniasis/HIV coinfection presented as a diffuse desquamative rash Case Rep. Infect. Dis. 2014: 293761

- Dassoni F, Abebe Z, Naafs B, Morrone A. 2013. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis resembling borderline-tuberculoid leprosy: a new clinical presentation? *Acta Derm. Venereol.*, 93:74-77.
- Davidson RN. 1999. Visceral Leishmaniasis in Clinical Practice. *J. Infect.* 39 (2), 112–116.
- Dea-Ayuela MA, Gutierrez LO, Fernandez F. 2009. Changes in the proteome and infectivity of *Leishmania infantum* induced by *in vitro* exposure to a nitric oxide donor. *International Journal of Medical Microbiology*, v.299, p.221–232.
- De Brito ME, Andrade MS, Dantas-Torres F, Rodrigues EH, Cavalcanti MP, de Almeida AM, Brandão-Filho SP. 2012. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 45: 425-429
- De Oliveira CI, Brodskyn CI. 2012. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol.* Jun 8;3:145.
- De Rezende E, Kawahara R, Peña, MS, Palmisano G, Stolf BS. 2017. Quantitative Proteomic Analysis of Amastigotes From *Leishmania (L.) amazonensis* LV79 and PH8 Strains Reveals Molecular Traits Associated With the Virulence Phenotype. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (11), e0006090.
- Dey R, Meneses C, Salotra P, Kamhawi S, Nakhasi HL, Duncan R. 2010. Characterization of a *Leishmania* stage-specific mitochondrial membrane protein that enhances the activity of cytochrome c oxidase and its role in virulence. *Molecular Microbiology.*77(2):399–4144.
- Eschenlauer SC, Faria MS, Morrison LS, Bland N, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, et al. 2009. Influence of Parasite Encoded Inhibitors of Serine Peptidases in Early Infection of Macrophages With *Leishmania Major*. *Cell. Microbiol.* 11 (1), 106–120.
- Espinosa OA, Serrano MG, Camargo EP et al. 2016. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, 15:1-13.
- Fialho-Junior L, da Fonseca-Pires S, Burchmore R, McGill S, Weidt S, Ruiz JC, Guimarães FG, Chapeourouge A, Perales J, de Andrade HM. 2021. Proteomic analysis reveals differentially abundant proteins probably involved in the virulence of amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *Parasitol Res.* 120(2):679-692.
- Forgber M, Basu R, Roychoudhury K, et al. 2006. Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology. *PLoS One*, v.40.
- Gavvani AS, Mohite H, Edrissian GH, Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. 2002. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 67, p. 511–

515. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR, Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.*, v. 17(6), p. 333-351.

Gramiccia M, Gradoni L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol.*, v. 35, p. 1169-1180.

Grimaldi-Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Rev Clin Microbiol* 1993; 6(3): 230-250.

Guimarães LH, Machado PRL, Lago EL et al. 2009 Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103:712–715.

Guimarães LH, Queiroz A, Silva JA et al. 2016. Atypical manifestations of cutaneous Leishmaniasis in a region endemic for *Leishmania braziliensis*: clinical, immunological and parasitological aspects. *PLoS Negl Trop Dis* 10(12): e0005100.

Heitman J, Movva NR, Hall MN. 1991. Targets for Cell Cycle Arrest by the Immunosuppressant Rapamycin in Yeast. *Sci.* 253 (5022), 905–909.

Hertz-Fowler C, Peacock CS, Wood V. 2004. GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic Acids Res*, v.32, p.339–43.

Heywood WE, Mmadgett TE, Wang D, Wallington A, Hogg J, Mills K, Avent, ND. 2011. 2D DIGE analysis of maternal plasma for potential biomarkers of Down Syndrome. *Proteome Science*. v.9, n.56, p. 1-10.

Horvatić A, et al. 2016. High-throughput proteomics and the fight against pathogens. *Molecular BioSystems*, v. 12, n. 8, p. 2373–2384.

Iborra S, Parody N, Abánades DR, Bonay P, Prates D, Novais FO, et al. 2008. Vaccination With the Leishmania Major Ribosomal Proteins Plus Cpg Oligodeoxynucleotides Induces Protection Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis in Mice. *Microbes Infect.* 10 (10-11), 1133–1141.

Iftikhar N, Bari I, and Ejaz A. 2003. Rare Variants of Cutaneous Leishmaniasis: Whitlow, Paronychia, and Sporotrichoid. *Int. J. Dermatol.* 42 (10): 807–809.

Jiang Q, Yan Y, Hu G, Zhang Y. 2005. Molecular Cloning and Characterization of a Peroxiredoxin From *Phanerochaete chrysosporium*. *Cell Mol. Biol. Lett.* 10, 659–668.

Karıncaoglu Y, Esrefoglu M, and Özcan H. 2004. Atypical Clinical Form of Cutaneous Leishmaniasis: Erysipeloid Form. *Int. J. Dermatol.* 43 (11): 827–829.

Kumari S, Kumar V, Tiwari RK, Ravidas V, Pandey K, Kumar A. 2022. Amphotericin B: A drug of choice for Visceral Leishmaniasis. *Acta Trop.* 235:106661.

Lage DP, Machado AS, Vale DL, et al. 2022. Recombinant guanosine-5'-triphosphate (GTP)-binding protein associated with Poloxamer 407-based polymeric micelles protects against *Leishmania infantum* infection. *Cytokine.* 153:155865.

Lainson R, Shaw JJ. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine.* Academic Press

Lainson R, Shaw JJ. 1998. New World Leishmaniasis - Neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology.* 9th ed. London/New York: Topley & Wilson; P. 241-68.

Lainson, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Rev Pan-Amaz Saude* 2010; 1(2):13-32

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, De Souza AA., Braga RR, Ishikawa EA. 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz;* 89(3): 435-443.

Lessa MM, Lessa HA, Castro TWN, et al. 2007. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology,* 73(6) 843-847.

Madeira da Silva L, Beverley SM. 2010. Expansion of the Target of Rapamycin(TOR) Kinase Family and Function in *Leishmania* Shows That TOR3 is Required for Acidocalcisome Biogenesis and Animal Infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (26), 11965–11970.

Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN et al 1986. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis*: Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 28:253–262.

Magalhães RDM et al. 2014. Identification of Differentially Expressed Proteins from *Leishmania amazonensis* Associated with the Loss of Virulence of the Parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases,* v. 8, n. 4, p. e2764.

Marouga R, David S, Hawkins E. 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* v.382, p. 669–678.

Marsden PD (1990). Leishmaniose Mucocutânea. *BMJ* 301: 656–657.

- Marsden PD 1994. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania Viannia braziliensis* L(V)b in Três Braços, Bahia-Brasil. Rev Soc Brasil Med Trop 27: 93-101.
- McGwire BS, and AR Satoskar. 2014. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* (107)1: 7-14.
- Meireles CB, Maia LC, Soares GC et al. 2017. Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Acta Trop* 172:240– 254.
- Mohapatra, Sarita. 2014 “Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments.” *Tropical parasitology* (4) 1: 4-9.
- Mokni M. 2019. Cutaneous leishmaniasis. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 146 (3) 232-246.
- Moreira DS, Murta SM. 2016. Involvement of Nucleoside Diphosphate Kinase B and Elongation Factor 2 in *Leishmania Braziliensis* Antimony Resistance Phenotype. *Parasit. Vectors* 9 (1), 641.
- Moreira DS, Pescher P, Laurent C, Lenormand P, Späth GF, Murta SM. 2015. Phosphoproteomic analysis of wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* lines by 2D-DIGE technology. *Proteomics*. Sep;15(17):2999-3019.
- Mottram C, Coombs GH. 1985. Purification of Particulate Malate Dehydrogenase and Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase From *Leishmania Mexicana Mexicana*. *Biochem. Biophys. Acta* 827 pp, 310–319.
- Nagy ZA, Szakács D, Boros, E, Héja D, Vígh E, Sándor N, et al. 2019. Ecotin, a Microbial Inhibitor of Serine Proteases, Blocks Multiple Complement Dependent and Independent Microbicidal Activities of Human Serum. *PloS Pathog.* 15 (12), e1008232.
- Negrão GN, Ferreira, MEMC. 2009. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar americana nas américas. *Revista Percurso*, v. 1 (1), p. 85–103.
- Negrão F, Diedrich JK, Giorgio S, Eberlin MN, Yates JR. 2019. Tandem Mass Tag Proteomic Analysis of *In Vitro* and *In Vivo* Models of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Parasite-Specific and Nonspecific Modulation of Proteins in the Host. *ACS Infect. Dis.* 5 (12), 2136–2147.
- Neitzke-Abreu HC, Venazzi MS, de Lima Scodro RB, Zanzarini PD, da Silva Fernandes AC, Aristides SM, Silveira TG, Lonardoní MV. 2014. Cutaneous leishmaniasis with atypical clinical manifestations: case report *IDCases*, 1:60-62.
- Nicodemo, AC, Amato VS, Miranda AM, Floeter-Winter LM, Zampieri RA, Fernandes ER, Duarte MI. 2012. Are the severe injuries of cutaneous leishmaniasis caused by an exacerbated Th1 response? *Parasite Immunol.*, 34: 440-443

Nirujogi R.S., Pawar H., Renuse S., Kumar P., Chavan S., Sathe G., Sharma J., Khobragade S., Pande J., Modak B., et al. 2014. Moving from unsequenced to sequenced genome: Reanalysis of the proteome of *Leishmania donovani*. J. Proteom.: 97:48–61.

Oliveira FS, Valete-Rosalino CM, Pacheco SJ, Costa FA, Schubach AO and Pacheco RS 2013. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. Parasites and Vectors 6, 189.

Oliveira IHR, Kjeldsen F, Melo-Braga MN, Verano-Braga T, de Andrade HM. 2022. Assessing the effects of *Leishmania (Leishmania) infantum* and *L. (L.) amazonensis* infections in macrophages using a quantitative proteome approach. Exp Parasitol. 243, 108413.

Omidian M, Mapar MA. 2006. Chronic zosteriform cutaneous leishmaniasis. Indian J Dermatol Venereol Leprol.;72(1):41–2.

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

Patino LH, Muñoz M, Cruz-Saavedra L, Muskus C, Ramírez JD. 2020. Genomic Diversification, Structural Plasticity, and Hybridization in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Front Cell Infect Microbiol. 10:582192.

Pawar H, Sathe G, Patole MS. 2020. Genome-Wide Proteomics and Phosphoproteomics Analysis of *Leishmania* spp. During Differentiation. Methods Mol Biol. 2116:161-176.

Pawar H, Renuse S, Khobragade SN, Chavan S, Sathe G, Kumar P, Mahale KN, Gore K, Kulkarni A, Dixit T, et al. 2014. Neglected Tropical Diseases and Omics Science: Proteogenomics Analysis of the Promastigote Stage of *Leishmania major* Parasite. OMICS: A Journal of Integrative Biology. 18 :499–512.

Peacock L, Ferris V, Bailey M, Gibson W. 2009. Intraclonal mating occurs during tsetse transmission of *Trypanosoma brucei*. Parasit Vectors; 2: 43.

Peacock, C., Seeger, K., Harris, D. et al. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat Genet 39, 839–847.

Pires SF, Fialho LC, Silva SO, Melo MN, Souza CC, Tafuri WL, Romero BO, Andrade HM. 2014. Identification of Virulence Factors in *Leishmania infantum* Strains by a Proteomic Approach. Journal of Proteome Res., v.13, p.1860–1872.

Pissarra J, Pagniez J, Petitdidier E, Séveno M, Vigy O, Bras-Gonçalves R, Lemesre JL, Holzmüller P. 2022. Proteomic Analysis of the Promastigote Secretome of Seven *Leishmania* Species. *J Proteome Res.* Jan 7;21(1):30-48.

Polpitiya AD, Qian WJ, Jaitly N, Petyuk VA, Adkins JN, Camp DG 2nd, Anderson GA, Smith RD. 2008. DAnTE: a statistical tool for quantitative analysis of -omics data. *Bioinformatics.* 13:1556-8.

Porteus, B. et al. 2011. Utility of gel-free, label-free shotgun proteomics approaches to investigate microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 2, p. 407–416.

Probst CM. et al. 2012. A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to *Leishmania amazonensis* infection. *BMC Microbiology*, v. 12, p. 1–12.

Quaresma PF, de Brito CFA, Rugani JMN, Freire JM, Baptista RP, Moreno EC, Gontijo RC, Rêgo FD, Diniz JE, Melo MN, Gontijo CMF. 2018. Distinct genetic profiles of *Leishmania (Viannia) braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. *Parasitology.* Aug;145(9):1161-1169.

Qureshi R, Jakkula P, Sagurthi SR, Qureshi IA. 2019. Protein Phosphatase 1 of *Leishmania Donovanii* Exhibits Conserved Catalytic Residues and Pro-Inflammatory Response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 516 (3), 770–776.

Ramírez JL, Guevara P Persistent Infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 1997. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz V.* 92 3:333-338

Rêgo FD, Da Rocha Lima A, Pereira AAS, Quaresma, PF, Pascoal-Xavier MA, Shaw JJ, et al. 2018. Genetic Variant Strains of *Leishmania (Viannia) Braziliensis* Exhibit Distinct Biological Behaviors. *Parasitol. Res.* 117, 3157– 3168.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A et al. 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science.*, v. 81, p. 68–75.

Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H et al. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7:581–596.

Rivas J, Fontanillo C. Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks. 2010, *PLoS Comp Biol*, vol. 6 pg. e1000807.

Rivas J, Fontanillo C. 2012. Protein–protein interaction networks: unraveling the wiring of molecular machines within the cell, *Briefings in Functional Genomics*, Volume 11, Issue 6, Nov, Pages 489–496.

Rodríguez-González J, Wilkins-Rodríguez AA, Gutiérrez-Kobeh, L.2018. Role Of Glutathione , ROS , and Bcl-xL in the inhibition of apoptosis of monocyte-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* promastigotes. *Parasitology Research*, v. 117, p. 1225–1235.

Rodríguez-Veja A, Losada-Barragán M, Berbert LR, Mesquita-Rodrigues C, Bombaça, A CS, Menna-Barreto R, et al. 2021. Quantitative Analysis of Proteins Secreted by *Leishmania (Viannia) Braziliensis* Strains Associated to Distinct Clinical Manifestations of American Tegumentary Leishmaniasis. *J. Proteomics* 232, 104077.

Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, et al. 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* 3:1154–69.

Rugani JN, Quaresma PF, Gontijo, CF; Soares RP, Monte-Neto RL. 2018. Intraspecies susceptibility of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to antileishmanial drugs: Antimony resistance in human isolates from atypical lesions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Volume 108, December, Pages 1170-1180.

Sanchiz Á, Morato E, Rastrojo A, Camacho E, González-de la Fuente SG, Marina A, Aguado B, Requena JM.2020. The Experimental Proteome of *Leishmania infantum* Promastigote and Its Usefulness for Improving Gene Annotations. *Genes (Basel)*. Sep 2;11(9):1036.

Serafim, TD, Coutinho-Abreu, IV, Oliveira F, et al.2018. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat Microbiol* 3: 548–555.

Shaheen F, Stephany-Brassesco I, Kelly BL. 2021. Dynamic modulation of *Leishmania* cytochrome c oxidase subunit IV (LmCOX4) expression in response to mammalian temperature. *Mol Biochem Parasitol*. 244:111391.

Singh, AK. Et al. 2015. Proteomic-based approach to gain insight into reprogramming of thp-1 cells exposed to *Leishmania donovani* over an early temporal window. *Infection and immunity*, 83(5): 1853–1868.

Sundar S and Rai M. 2002. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *American Society for Microbiology: Clinical and Vaccine Immunology*, 9 (5): 951-958.

Tagliazucchi L, Perea-Martinez A, Fiorini G, Manzano JI, Genovese F, García-Hernández R, Pinetti D, Gamarro F, Costi MP. 2023. Label-Free Mass Spectrometry Proteomics Reveals Different Pathways Modulated in THP-1 Cells Infected with Therapeutic Failure and Drug Resistance *Leishmania infantum* Clinical Isolates. *ACS Infect Dis*. Mar 10;9(3):470-485.

Taslimi Y, zahedifard, F, & rafati, S. 2018. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology*, 145(4): 497-507.

Thompson A, Schafer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, et al. 2003. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* 75:1895–904

Tsurugi K, Collatz E, Todokoro K, Ulbrich N, Lightfoot HN, Wool IG. 1978. Isolation of Eukaryotic Ribosomal Proteins. Purification and Characterization of the 60 s Ribosomal Subunit Proteins La, Lb, Lf, P1, P2, L13', L14, L18', L20, and L38. *J. Biol. Chem.* 253 (3), 946–955.

Veras PST, de Menezes, JPB. 2016. Using proteomics to understand how *Leishmania* parasites survive inside the host and establish infection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 8.

Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, Warscheid B. 2007. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research; *Proteomics*. 7(3): 340–350.

Wilkins, MR. et al. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 13, n. 1, p. 19–50, 1996.

Wilkins MR, Pasquali C. 1996. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*, v.14, p.61-66.

World Health Organization (WHO) 2023. Leishmaniasis. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1 Acesso em: 10 abr. 2023.

Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. (2004). Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol, Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania Donovanii*. *J. Biol. Chem.* 279, 39925–39932.

Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, & Paša-Tolić L. 2014. High-Throughput Proteomics. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 7(1): 427–454.

ANEXO

1. Artigo publicado

Artigo publicado: Esteves BB, Melo-Braga MN, Gorshkov V, Verano-Braga T, Larsen MR, Gontijo CMF, Quaresma PF, Andrade HM. 2022. Characterization of Differentially Abundant Proteins Among *Leishmania (Viannia) braziliensis* Strains Isolated From Atypical or Typical Lesions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 12: 2235-2988. DOI:10.3389/fcimb.2022.824968.



Characterization of Differentially Abundant Proteins Among *Leishmania (Viannia) braziliensis* Strains Isolated From Atypical or Typical Lesions

Bárbara B. Esteves¹, Marcella N. Melo-Braga², Vladimir Gorshkov³, Thiago Verano-Braga⁴, Martin R. Larsen³, Célia M. F. Gontijo⁵, Patricia F. Quaresma⁶ and Helida M. Andrade^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Juliana Perrone Bezerra De Menezes,
Gonçalo Moniz Institute (IGM), Brazil

Reviewed by:

Patricia Cuervo,
Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz),
Brazil

Celio Gerardo Freire-de-Lima,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

*Correspondence:

Helida M. Andrade
helidandrade@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 29 November 2021

Accepted: 14 January 2022

Published: 15 February 2022

Citation:

Esteves BB, Melo-Braga MN,
Gorshkov V, Verano-Braga T,
Larsen MR, Gontijo CMF,
Quaresma PF and Andrade HM (2022)
Characterization of Differentially
Abundant Proteins Among *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis* Strains Isolated
From Atypical or Typical Lesions.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:824968.
doi: 10.3389/fcimb.2022.824968

¹ Laboratório de Leishmanioses, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Laboratório de Biologia Sintética e Biomiméticos, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense, Denmark, ⁴ Núcleo de Proteômica Funcional, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁵ Study Group in Leishmaniosis, Instituto René Rachou (IRR) –Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/MG) Belo Horizonte, Belo Horizonte, Brazil, ⁶ Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Leishmania (Viannia) braziliensis is the main etiological agent of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Latin America. Non-ulcerated atypical tegumentary leishmaniasis cases caused by *L. braziliensis* have been reported in several regions of the American continent, including the Xacriabá indigenous reserve in São João das Missões/Minas Gerais, Brazil. Parasites isolated from these atypical clinical lesions are resistant to antimony-based therapeutics. In the present study, proteins displaying differential abundance in two strains of *L. braziliensis* isolated from patients with atypical lesions compared with four strains isolated from patients with typical lesions were identified using a quantitative proteomics approach based on tandem mass tag labeling (TMT) and mass spectrometry. A total of 532 ($P < 0.05$) differentially abundant proteins were identified (298 upregulated and 234 downregulated) in strains from atypical lesions compared to strains from typical lesions. Prominent positively regulated proteins in atypical strains included those that may confer greater survival inside macrophages, proteins related to antimony resistance, and proteins associated with higher peroxidase activity. Additionally, we identified proteins showing potential as new drug and vaccine targets. Our findings contribute to the characterization of these intriguing *L. braziliensis* strains and provide a novel perspective on Atypical Cutaneous Leishmaniasis (ACL) cases that have been associated with therapeutic failures.

Keywords: *Leishmania braziliensis*, atypical wounds, proteome, abundance, TMT, antimony resistance

1 INTRODUCTION

In different parts of the world, authors have referred to Atypical Cutaneous Leishmaniasis (ACL) cases as sporotrichoid, reported in Pakistan, but no *Leishmania* species was identified (Iftikhar et al., 2003), erysipeloid, reported in Anatolia, Turkey, also unidentified species of *Leishmania* (Karincaoglu et al., 2004), recidiva cutis, caused by *L. panamensis* (Calvopina et al., 2005) or zosteriform, reported in Iran (Omidian and Mapar, 2006). On the other hand, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is an important *Leishmania* species that circulates in several North and South American countries. This species can cause a wide spectrum of clinical manifestations ranging from single and typical lesions with a granular background and raised edges, known as cutaneous leishmaniasis (CL), to the involvement of nasal and oral mucous membranes, also known as the cutaneous-mucosal or mucosal form (Lainson and Shaw, 1998). The spectrum of injuries caused by *L. braziliensis* also includes reports of atypical cutaneous leishmaniasis (ACL), with characteristics such as papules, verrucous and keloid lesions, and crusted and ulcerated plaques, distinct from those presented by common injuries (Baptista et al., 2009; Guimarães et al., 2009; Quaresma et al., 2018). In an area hyperendemic for *L. braziliensis* transmission in northeastern Brazil, ACL accounted for 1.9% of all tegumentary leishmaniasis cases (Guimarães et al., 2009). Possible causes associated with ACL are host immune status (pregnancy, co-morbidities, immunosuppression (Iftikhar et al., 2003; Omidian and Mapar, 2006), environmental factors, and strain of the parasite (Guimarães et al., 2016). However, the majority of such patients do not present with clinical co-morbidities or HIV infection and are not using immunosuppressive drugs (Da-Cruz et al., 1999). Furthermore, *L. braziliensis* is characterized by variable infectivity, virulence, and response to anti-leishmanial therapy (Rego et al., 2018; Patino et al., 2019a); thus, there is no consensus on the factors involved in cases of ACL, although these data seem to suggest that parasite factors may be more determinant.

In Brazil, ACL cases have been reported in the states of Rio de Janeiro (Baptista et al., 2009), Bahia (Guimarães et al., 2009), and Minas Gerais (Quaresma et al., 2018) and are associated with genetic variations of the parasite and lower response to treatment with antimonials. In the state of Minas Gerais (MG), ACL cases were observed in patients from the Xacriabá indigenous reserve located in the municipality of São João das Missões. The reserve is predominantly composed of Brazilian savannah (cerrado) vegetation, and *Lutzomyia intermedia* is the main vector of *L. (V.) braziliensis* in this region (Rego et al., 2018). In patients from Xacriabá, cytokine/chemokine expression in skin biopsies is associated with the time of lesions, but not with the type of injury. Additionally, histopathological analysis of cutaneous tissue samples did not show any differences between patients with different types of lesions (Costa-Silva et al., 2014). However, genetic polymorphisms are correlated with typical or atypical clinical manifestations (Quaresma et al., 2018). A large number of therapeutic failures were observed in patients with atypical

lesions, and an *in vitro* study of antileishmanial drug susceptibility reported that strains from atypical manifestations are more resistant to Glucantime, the antileishmanial treatment recommended by the WHO (Rugani et al., 2019). Moreover, atypical manifestations have been demonstrated to be related to therapeutic failure (Guimaraes et al., 2016).

Proteomic analysis is a fundamental tool for understanding physiological processes and for studying the relationships between the genotype and the phenotype. Quantitative proteomics have been used for several *Leishmania* species in studies aiming at different aspects of biology, such as identifying protein modification during differentiation in *L. donovani* (Pawar et al., 2020), identification of differentially abundant proteins probably involved in the virulence of amastigote and promastigote forms of *L. infantum* (Fialho-Junior et al., 2021), and analysis of *in vitro* and *in vivo* models of cutaneous leishmaniasis using *L. amazonensis* and *L. major* (Negrao et al., 2019). Here, we performed a proteomic analysis using TMT labeling followed by mass spectrometry (MS) to identify differentially abundant proteins in *L. braziliensis* promastigotes that cause typical and atypical lesions. Our findings contribute to the characterization of the selected *L. braziliensis* strains, highlighting the importance of conducting new studies to elucidate the factors involved in the wide diversity of clinical manifestations and drug response outcomes in clinical practice.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Ethics Statement

Leishmania field strains were obtained from human patients living in the Xacriabá indigenous community located in São João das Missões municipality, Minas Gerais, Brazil (Quaresma et al., 2018). Samples from other endemic areas were obtained from the outpatient care clinic at Centro de Referência em Leishmanioses – Instituto René Rachou-IRR/FIOCRUZ from 1993 to 1998. All patients involved in this study provided written informed consent, and experimental procedures were approved by the IRR Research Ethics Committee in Human Research, the National Committee for Research Ethics (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP; process 355/2008), and the National Indian Foundation (Fundação Nacional do Índio – FUNAI; n° 149/CGEP/08).

2.2 Parasites

The *L. braziliensis* strains from typical (LbTL) lesions were isolated from patients from Belo Horizonte, MG, Brazil, identified as MHOM/BR/95/RR051 and BH17 and from São João das Missões, MG, Brazil identified as MHOM/BR/08/426 and MHOM/BR/09/346. The strains from atypical lesions (LbAL) were isolated from São João das Missões, MG, Brazil, identified as MHOM/BR/08/316 and MHOM/BR/08/340. The clinical features of typical and atypical lesions from which the parasites were isolated and the isolation and confirmation of the species were

performed as described by Quaresma et al. (2018). In summary, the typical lesions were characterized like circular or oval ulcers with an erythematous, infiltrated, firm, reddish and granular base and a well-delimited, elevated border. Atypical lesions were defined by the presence of unusual cutaneous wounds.

The isolation procedures were accomplished added lesion fragments to tubes containing NNN medium (Novy and McNeal, 1903; Nicolle, 1908) enriched with liquid Schneider's medium and incubated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. The cultures were examined weekly and were considered positive when *Leishmania* promastigotes were observed. The species identification methods performed for characterizing the isolates used in this study was done by the *Leishmania* Isolation, Culture and Typing Service of the Leishmania Collection of the Oswaldo Cruz Institute (Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC) according to the protocol described by Cupolillo et al. (1994). We also used hsp70-PCR-RFLP which amplified a 1300-bp fragment of the hsp70 gene and subsequently the restriction profiles were obtained from HaeIII digestion of the PCR products. In addition to these methods the sequencing of the 1,300 bp fragment of hsp70 were performed. The combination of identification methods allowed the characterization of parasites as *L. braziliensis*.

Promastigotes of *L. braziliensis* were maintained in M199 culture media (SigmaAldrich/Merck) supplemented with 10% fetal bovine serum (ThermoFischer/Gibco), 100 units/mL penicillin (ThermoFischer/Gibco), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (ThermoFischer/Gibco), 12.5 mM glutamine (ThermoFischer/Gibco), 0.1 M adenine (SigmaAldrich/Merck), 205 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hemin, and 40 mM HEPES (SigmaAldrich/Merck), pH 7.4 at 26°C . Overall, six isolates were evaluated: four from typical lesions and two from atypical lesions. All strains were cultivated in independent triplicates under identical conditions until the 9th passage, when promastigotes were obtained in the final stage of the stationary growth phase. This phase was established after performing the growth curve for eight consecutive days. During this period, motility and morphological aspects such as cell body and flagellum length were also observed. Thus, promastigotes forms were harvested in the stationary phase (5th day) by centrifugation at $3,000 \times g$ for 15 min at 4°C . Cell pellets were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and frozen at -80°C until use.

2.3 Quantitative Proteomics

2.3.1. Protein Extraction and TMT-Labeling

Frozen promastigotes, as described above, (LbAL and LbTL) were lysed for 2 h at 24°C in lysis buffer [8 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 65 mM dithiothreitol (DTT), 1 M Tris, 40 mM protease inhibitor cocktail containing serine protease inhibitors, and cysteine protease inhibitors (Protease Inhibitor Mix; GE Healthcare, USA)] at a density of 500 μL per 10^9 parasites. The cell lysate was passed 10 times through a 26G needle and centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min. The supernatant was aliquoted and stored in a freezer at -80°C until use. Protein concentration was determined using a QuantKit 2D (GE Healthcare) according to the manufacturer's recommendations.

Equal amounts of protein (300 μg) from each sample were reduced *via* incubation with 50 mM dithiothreitol (DTT) for 1 h at 24°C and subsequently alkylated with 150 mM iodoacetamide (IAA) for 30 min at room temperature in the dark. Before the digestion step, the samples were washed with buffer (6M urea and 50 mM TEAB) to dilute the CHAPS present in the lysis buffer. Protein purification and concentration filters (Micon[®] Ultra-0.5 mL) were used for these washes. Enzymatic digestion was performed using trypsin (Promega, Madison) at a ratio of 1:50 for 16 h at 37°C .

After protein digestion, peptides were labeled with specific isobars from the TMT[®] 10plex Isobaric Mass Tagging Kit (Thermo Fisher Scientific/Pierce Biotechnology, Rockford, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, 15 μg of each sample was labelled with 0.266 mg of an isobaric amine-reactive tag (TMT10-126, TMT10-127N, TMT10-127C, TMT10-128N, TMT10-128C, and TMT10-129N). The reaction mixture was incubated for one hour at room temperature for complete labeling. The reaction was quenched by the addition of 5% hydroxylamine, and labelled peptides were combined at a ratio of 1:1:1:1:1:1. The samples were dried using a SpeedVac and stored for further analysis. The preparation process was performed in biological triplicates.

2.3.2 High pH Reversed Phase Pre-Fractionation

Labeled peptide mixtures were dissolved in buffer A (20 mM ammonium formate, pH 9.3) and fractionated using an Acquity UPLC M-Class Peptide CSH C18 column (1.7 μm , 300 μm x 100 mm) (Waters) on an UltiMate 3000 high-pressure liquid chromatography (HPLC) system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) operating at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Each set was eluted using the following chromatographic gradient expressed as a percentage of solvent B (20% solution A/80%ACN): 2–40% for 27 min, 40–50% in 4 min, 50–70% in 4 min, and 70–95% in 5 min. Each sample was separated into 15 fractions that were further merged into five concatenated fractions, and dried using a SpeedVac prior to MS analysis.

2.3.3 LC-MS/MS

Pre-fractionated TMT-labeled peptides were resuspended in solvent A (0.1% (v/v) formic acid) and subsequently injected into an EASY-nLC system (Thermo) with a two-column system setup. The pre-column was 3 cm in length and 100 μm in inner diameter, and it was packed with 5 μm (particle size) Reprosil-Pur C18-AQ resin (Dr. Maisch GmbH). An analytical column (17 cm x 75 μm) was packed with a 3 μm Reprosil-Pur C18-AQ resin (Dr. Maisch GmbH). Peptides from each fraction were eluted for 68 min using the following gradient expressed as a percentage of solution B (95% acetonitrile/0.1% formic acid): 2–5% in 1 min, 5–25% in 50 min, 25–40% in 10 min, 40–95% in 1 min, 95% in 5 min and 95–2% in 1 min, at a constant flow of 300 nL/min. The Q Exactive HF-X hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo) was operated in positive mode using data-dependent acquisition (DDA) (Top 20). Peptide ions were resolved in the Orbitrap (MS), in the range of 350 to 1500 m/z with a resolution of 120,000 FWHM (AGC target 3e6 or

maximum injection time of 50ms). At each MS, the 20 most intense ions (Top 20), with the minimum AGC target 1e3, were selected in the quadrupole, using an isolation window equal to 0.7 m/z. These ions were selected for fragmentation (MS2) by higher-energy collision dissociation (HCD), with a normalized collision energy of 33%. The originating fragments were resolved in Orbitrap with a resolution of 45,000 FWHM (AGC target 1e5 or maximum injection time of 60 ms) and included in a dynamic exclusion list for 30 s.

2.3.4 Data Analysis

Raw data were analyzed using the Proteome Discoverer 2.1 software. The database search was performed by the SEQUEST using the *Leishmania braziliensis* NCBI database (25,611 sequences). Database search parameters included: i) maximum of two trypsin missing cleavages, ii) carbamidomethylation of cysteine as a fixed modification, iii) oxidation of methionine, N-terminal acetylation of protein, and TMT 6plex (lysine and N-terminal peptide) as variable modifications, iv) precursor and fragment mass tolerance of 10 ppm and 0.02 Da, respectively; v) 1% false discovery rate (FDR); and vi) unique peptides plus razor ones were grouped into the respective proteins. Only master proteins with a 1% FDR were considered for the analysis.

Before statistical analyses, we normalized the log₂ transformed ion reporter abundance using the “control” sample (pool of all analyzed samples) for all three datasets. Subsequently, data were normalized by subtracting the median of each group using the Perseus program (<https://maxquant.net/perseus>). After combining the three sets, we subtracted the average over all conditions (biological/technical) for each protein. Proteins significantly regulated between LbAL and LbTL conditions were determined by the one-way ANOVA statistical test ($P < 0.05$) plus log₂ fold change of 0.584, using DanteR software (Polpitiya et al., 2008).

The differentially abundant proteins were functionally categorized through annotations of biological processes (BP) and molecular functions (MF) cataloged according to the Gene Ontology (GO) consortium. This set of genomic data was analyzed using the bioinformatics platform TriTrypDB release 40 (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). For each category, Fischer’s exact test was used to test the enrichment of selected proteins against all proteins identified in the study. A false discovery rate (FDR) and an adjusted $P < 0.05$ were set as thresholds to define the significance of the functional enrichment.

To evaluate the potential relationship among these proteins using enriched GO categories, we predicted the protein-protein interaction networks associated with the whole proteome of the organism. For this prediction analysis, we used the STRING 10.5 database with a cut-off value of 0.4 considered to be of medium confidence. This database provides a network of predicted interactions or interactions already described in the literature between proteins or between genes (protein-protein interaction networks, <http://string-db.org>). Finally, the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database was used via the metabolic pathways enrichment tool (TriTrypDB bioinformatics platform) to analyze the pathways of the

identified differentially abundant proteins and to understand their biological significance.

2.3.5 Data Availability Statement

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD029995.

2.4 Validation Proteomic Data

2.4.1 Peroxidase Activity

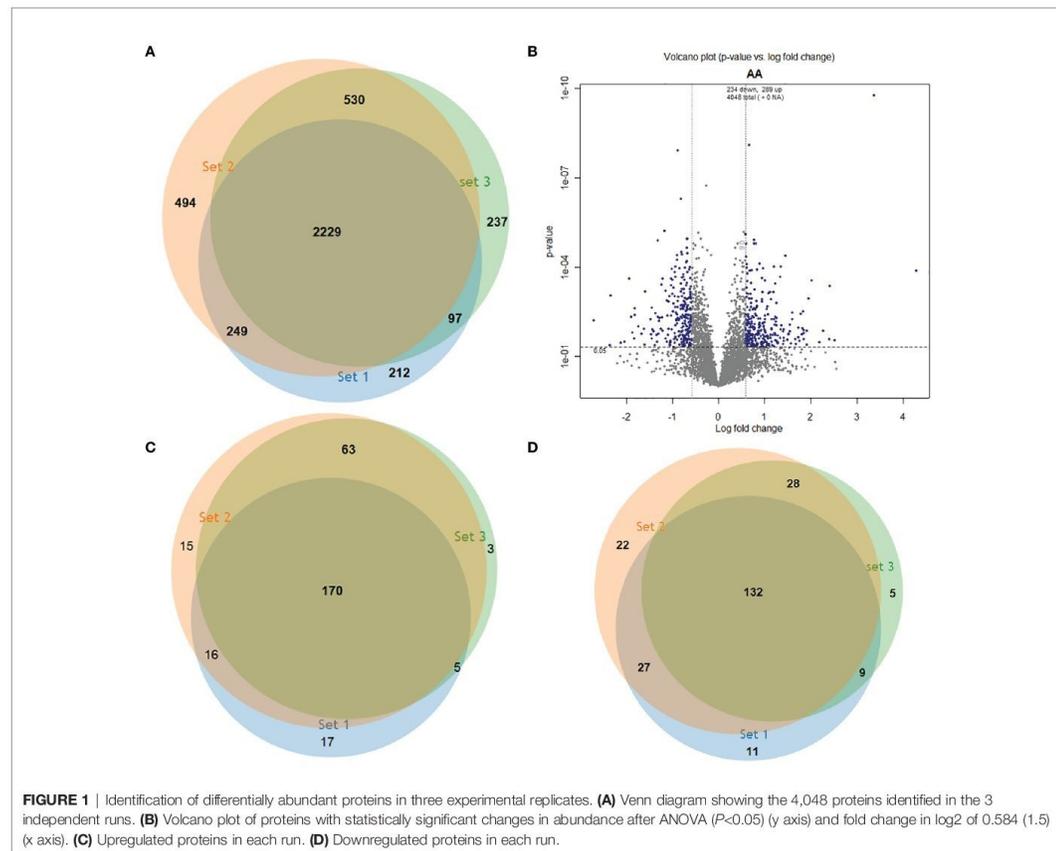
Peroxidase activity was measured using 10^8 promastigotes from each strain in the LbTL and LbAT groups. Promastigotes were lysed by gentle shaking in 50 μ L of 0.1% Triton X-100 for 30 min at room temperature. Next, 50 μ M H₂O₂ (final concentration) was added, followed by incubation at 37°C for 30 min. The reaction was stopped by adding 0.75 mL of trichloroacetic acid solution (8% v/v), and the precipitate was removed by centrifugation. To the supernatant, 0.2 mL of 10 mM ferrous ammonium sulphate and 0.1 mL of 2.5 M potassium thiocyanate were added, and the remaining amount of H₂O₂ was determined spectrophotometrically (480 nm) by calibration against a standard curve with known concentrations of H₂O₂ (Jiang et al., 2005).

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data are presented as means of the group. Comparisons between different groups were made using one-way ANOVA followed by Bonferroni’s test, and statistical significance was set at $P < 0.05$.

3 RESULTS

3.1 Identification and Relative Abundance of Proteins From Atypical and Typical Strains

We performed an isobaric tagging and high-resolution mass spectrometry strategy to compare the proteome of *L. braziliensis* strains that cause atypical lesions (LbAL, n=2) and *L. braziliensis* strains that cause typical lesions (LbTL, n=4). Each strain was analyzed in triplicate, resulting in triplicates of independent experiments. This approach enabled the identification of 4,048 non-redundant proteins (Supplementary Table S1), of which 2,229 proteins were present in all three independent runs (Figure 1A). To assess the differentially abundant proteins, we compared the relative abundance values of the identified proteins in LbAL versus LbTL strains. Our results showed that the abundance of 298 and 234 proteins significantly increased and decreased in LbAL strains, respectively, compared to LbTL strains (Figure 1B). However, when we considered only proteins identified in at least two of the three runs, 254 (Supplementary Table S2) and 196 (Supplementary Table S3) proteins were upregulated and downregulated at LbAL versus LbTL (Figures 1C, D).



3.2 Functional Analysis

Gene Ontology (GO) data were used to glean insights into the differences between atypical and typical *L. braziliensis* strains. The GO enrichment of regulated proteins associated GO term to 37 proteins with increased abundance and 16 with decreased abundance in atypical strains compared to typical strains. These proteins were categorized into functional groups (Figure 2).

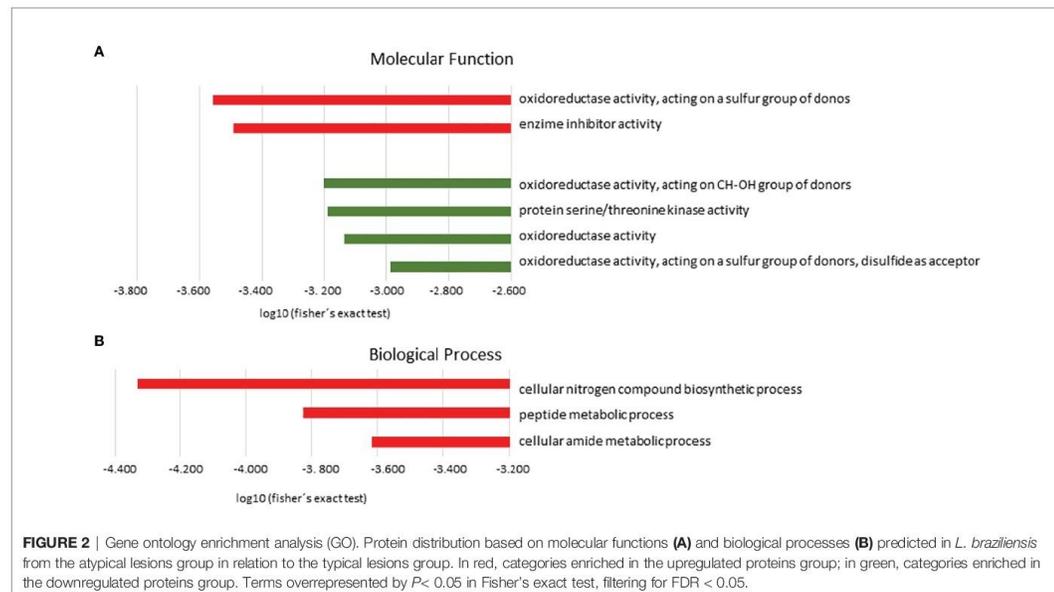
Regarding Molecular Function (MF), the category Oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors ($P = 4.11e-4$) followed by enzyme inhibitor activity ($P = 3.33e-4$) were significantly enriched in the group of upregulated proteins. These groups are represented mainly by the following proteins: trypanothione reductase, peptide methionine sulfoxide reductase-like, and ecotin. In the group of downregulated proteins, we observed that oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors ($6.27e-4$), protein serine/threonine kinase activity ($P = 6.45e-4$), oxidoreductase activity ($P = 7.30e-4$), and oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors, disulfide as acceptor ($P = 1.03e-3$) were among the significant categories. These groups are represented mainly by the following

proteins: malate dehydrogenase and choline dehydrogenase (Figure 2A and Table 1).

The biological process (BP) with statistical significance among proteins with increased abundance in atypical strains compared to typical strains were cellular nitrogen compound biosynthetic process ($P = 4.68e-5$ with 27 proteins), peptide metabolic process ($P = 1.49e-4$ with 20 proteins), and cellular amide metabolic process ($P = 2.42e-4$ with 20 proteins). These groups are mainly represented by ribosomal proteins. In contrast, no significantly enriched category was found for downregulated proteins (Figure 2B and Table 2)

3.3 Prediction of Protein-Protein Interaction (PPI)

To identify possible interactions between the identified proteins, a prediction analysis of protein interactions was performed using String 10.5. The network obtained was composed of 21 upregulated and 9 downregulated proteins. The obtained networks were later edited in Cytoscape 3.4.0, to assign colors to positive and negative adjustment values. The positively



regulated proteins interacted with each other, mainly represented by reductase proteins, and similarly, the negatively regulated proteins interacted with each other, mainly represented by dehydrogenases proteins. Moreover, it is possible to observe the interactions among ribosomal proteins, all of which are positively regulated in strains isolated from atypical lesions compared to strains isolated from typical lesions (Figure 3).

3.4 Analysis of Enrichment of Metabolic Pathways

The KEGG tool was used to identify the most relevant pathways associated with regulated proteins in the promastigote forms of *Leishmania*, causing atypical lesions. Regarding positively regulated proteins, the analysis showed the enrichment of five pathways: cysteine and methionine metabolism ($P=1.58e-4$, with 10 proteins), glutathione metabolism ($P=5.96e-3$, with 6 proteins), phenylalanine metabolism ($P=6.79e-3$, with 6 proteins), polyketide sugar unit biosynthesis ($P=8.46e-3$, with 6 proteins), and tyrosine metabolism ($P=9.85e-3$, with 9 proteins). In contrast, negatively regulated proteins participated in six pathways: carbon fixation pathways in prokaryotes ($P=1.37e-4$, with 8 proteins); valine, leucine, and isoleucine degradation ($P=4.60e-3$, with 5 proteins); benzoate degradation ($P=7.99e-3$, with 5 proteins); glyoxylate and dicarboxylate metabolism ($P=8.69e-3$, with 5 proteins); geraniol degradation ($P=9.85e-3$, with 3 proteins); and one carbon pool by folate ($P=9.85e-3$, with 3 proteins) (Figure 4). Proteins belonging to each pathway are listed in Table 3, where it can be observed that each protein participates in more than one pathway, except in the case of glutathione metabolism. To verify the interactions between the identified proteins belonging to the enriched pathways, prediction analysis of protein interactions was performed

(Figure 5), highlighting that the dehydrogenases were negatively regulated and interacted with each other, and trypanothione and trypanredoxin were positively regulated and interacted with each other.

3.5 Peroxidase Activity

Glutathione (GSH) plays a central role in cell defense against oxidative stress. In trypanosomatids, the removal of peroxides is performed by trypanredoxin peroxidase (Collotti et al., 2013). Trypanredoxin peroxidase was found among the upregulated proteins belonging to the glutathione pathway (ratio LbAL vs LbTL = 0.993897). Therefore, the antioxidant capacities of different strains were evaluated. Since after 30 min of exposure to 50 μM hydrogen peroxide, protein extracts from strains belonging to the atypical group consumed all H_2O_2 , the reported value should be interpreted as lower boundary (no standard deviation can be calculated), while those in the typical group consumed an average of 15.7 μM of H_2O_2 . The hydrogen peroxide consumption in the atypical group was 3.01-fold higher than that in the typical group ($P < 0.001$; Figure 6).

4 DISCUSSION

Determining factors of atypical cutaneous leishmaniasis (ACL) caused frequently by *Leishmania (Viannia) braziliensis* remain unclear. It is possible that these clinical forms are determined by host and parasite factors, as demonstrated for other clinical forms of leishmaniasis. However, histopathological analysis of cutaneous tissue samples and cytokine/chemokine expression in skin biopsies from ACL patients showed no association with the

TABLE 1 | Gene Ontology (GO) enrichment analysis of Molecular Function in differentially regulated proteins in *L. braziliensis* from atypical lesion (LbAL) compared to *L. braziliensis* from typical lesion (LbTL).

TERM	Fold change (P value)	PROTEINS	RATIO (LbAL vs LbTL)		
Upregulated proteins					
<i>Oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors</i>	7.43 (4.11e-4)	trypanothione reductase	2.417		
		peptide_methionine sulfoxide reductase-like	1.060		
		putative thioredoxin	0.984		
		thiol-dependent_reductase_1	0.709		
		putative glutaredoxin-like protein	0.649		
<i>Enzyme inhibitor activity</i>	18.26 (3.33e-4)	ecotin	1.917		
		Ecotin-like protein 2	0.797		
		Protein phosphatase inhibitor 2 (IPP-2)	0.768		
Downregulated proteins					
<i>Oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors</i>	7.02 (6.27e-4)	mitochondrial malate dehydrogenase	-1.150		
		choline dehydrogenase like protein,	-1.062		
		glycosomal malate dehydrogenase	-0.944		
		dehydrogenase-like protein	-0.888		
		putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0.825		
<i>Protein serine/threonine kinase activity</i>	9.70 (6.45e-4)	putative target of rapamycin (TOR) kinase 1	-1.744		
		putative protein kinase	-1.029		
		protein kinase A catalytic subunit isoform 1	-0.765		
		protein kinase A catalytic subunit	-0.676		
		mitochondrial malate dehydrogenase	-1.150		
<i>Oxidoreductase activity</i>	2.73 (7.30e-4)	choline dehydrogenase, like protein	-1.062		
		putative short chain dehydrogenase	-1.017		
		conserved hypothetical protein (134065654)	-0.978		
		glycosomal malate dehydrogenase	-0.944		
		putative endoplasmic reticulum oxidoreductin	-0.938		
		dehydrogenase-like protein	-0.888		
		putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0.825		
		fatty acid desaturase	-0.700		
		aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	-0.696		
		conserved hypothetical protein (134063632)	-0.662		
		putative C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	-0.655		
		putative endoplasmic reticulum oxidoreductin	-0.938		
		conserved hypothetical protein (134063632)	-0.662		
		<i>Oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors, disulfide as acceptor</i>	35.57 (1.03e-3)	putative C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	-0.655
				putative endoplasmic reticulum oxidoreductin	-0.938

Proteins sorted by log2-ratio.

type of injury (Costa-Silva et al., 2014). In contrast, the parasite presented genetic polymorphism correlated with atypical clinical manifestations (Quaresma et al., 2018) and was more resistant to N-methylglucamine antimonate (Rugani et al., 2019); clinical cases have been associated with therapeutic failures (Guimarães et al., 2016). Thus, we performed a comparative proteomic analysis to identify differentially abundant proteins among *L. (V.) braziliensis* strains isolated from atypical lesions (LbAL) compared to isolates from typical lesions (LbTL). The strains used in the present study were previously characterized for genetic polymorphism, as well as for resistance to N-methylglucamine antimonate; the typical strains are genetically non-polymorphic and sensitive to glucantime, whereas the atypical strains are genetic polymorphic and resistant to N-

methylglucamine antimonate (Rugani et al., 2018; Quaresma et al., 2018).

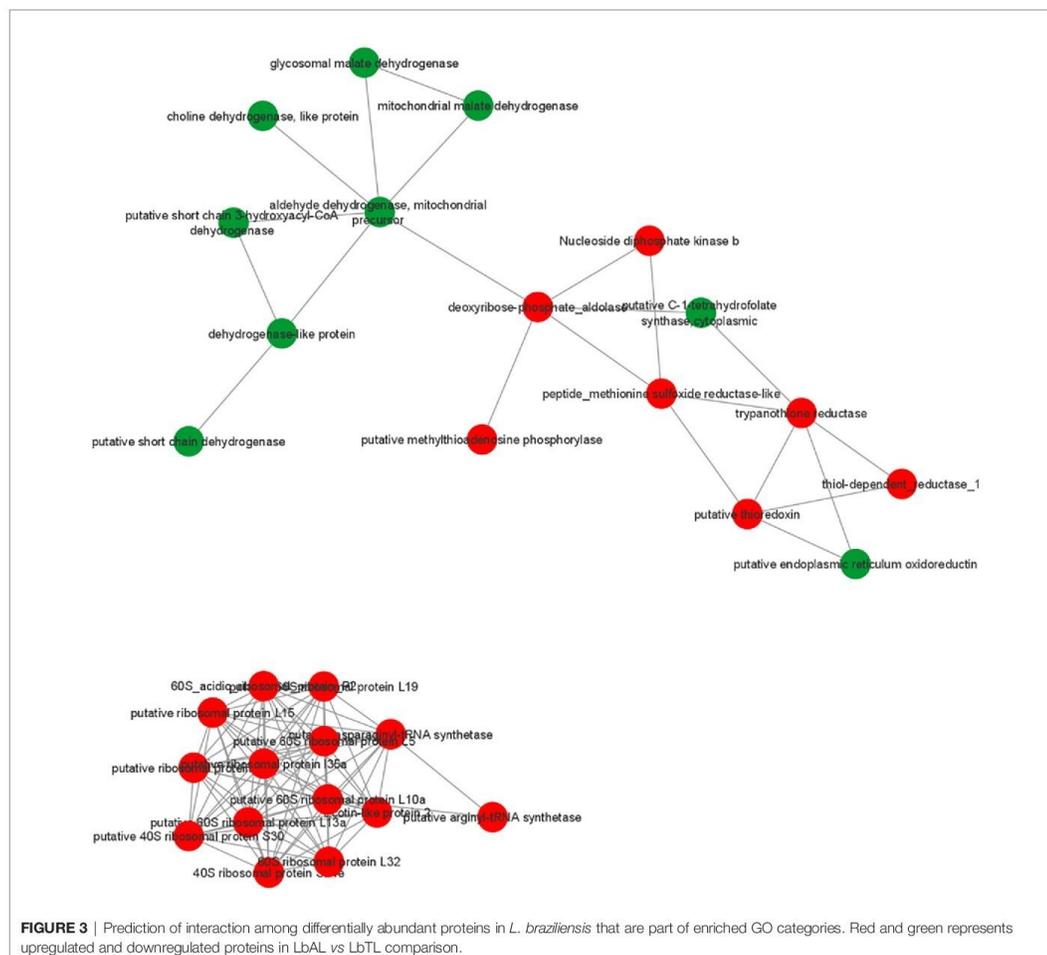
Since the role of the parasite in a large clinical plasticity of *L. braziliensis* infections is not clear this study aims to contribute to the knowledge about the factors involved in such pleomorphism. We quantified 4,048 proteins, of which 254 and 196 proteins showed increased and decreased abundance, respectively, in atypical strains compared to typical strains. To identify potential factors related to each strain, proteins were categorized into functional groups based on molecular function (MF) and biological process (BP), followed by prediction analysis of protein interactions (PPI) as well as pathway enrichment analysis using the KEGG tool. The data pointed to upregulated redox activity in atypical strain, among others, the peroxidase activity test validated the findings.

TABLE 2 | Gene Ontology (GO) enrichment analysis of Biological Process in differentially regulated proteins in *L. braziliensis* from atypical lesion (LbAL) compared to *L. braziliensis*. Proteins sorted by log2-ratio.

TERM	Fold change (P value)	PROTEINS	RATIO (LbAL vs LbTL)
Upregulated proteins			
<i>Cellular nitrogen compound biosynthetic process</i>	2.22 (4.68e-5)	putative 60S ribosomal protein L10a	1.807
		40S ribosomal protein S24e	1.398
		60S ribosomal protein L32	1.357
		putative DNA-directed RNA polymerase II	1.342
		FtsJ-like_methyltransferase	1.287
		DNA_primase_large_subunit	1.237
		Chain B, Dihydroorotate dehydrogenase	1.224
		nucleoside diphosphate kinase b	1.072
		putative 60S acidic ribosomal protein	1.048
		putative 40S ribosomal protein S30	1.041
		deoxyribose-phosphate_aldolase	0.969
		conserved hypothetical protein	0.954
		kynureninase	0.952
		conserved hypothetical protein	0.891
		60S_acidic_ribosomal_protein_P2	0.816
		inosine-guanosine_transporter	0.770
		acidic ribosomal P2 beta protein	0.769
		putative methylthioadenosine phosphorylase	0.717
		putative 60S ribosomal protein L13a	0.712
		putative 60S ribosomal protein L19	0.708
		putative arginyl-tRNA synthetase	0.669
		putative ribosomal protein S7	0.624
		putative asparaginyl-tRNA synthetase	0.623
		putative ribosomal protein I35a	0.616
		putative ribosomal protein L27	0.609
		putative ribosomal protein L15	0.601
		putative 60S ribosomal protein L5	0.601
		putative 60S ribosomal protein I10a	1.807
Peptide metabolic process and	2.47 (1.49e-4)		
Cellular amide metabolic process	2.38 (2.42e-4)	40S ribosomal protein S24e	1.398
		60S ribosomal protein L32	1.357
		FtsJ-like_methyltransferase	1.287
		conserved hypothetical protein	1.119
		putative 60S acidic ribosomal protein	1.048
		putative 40S ribosomal protein S30	1.041
		conserved hypothetical protein	0.891
		60S_acidic_ribosomal_protein_P2	0.816
		acidic ribosomal P2 beta protein	0.769
		putative 60S ribosomal protein L13a	0.712
		thiol-dependent_reductase_1	0.709
		putative 60S ribosomal protein L19	0.708
		putative arginyl-tRNA synthetase	0.669
		putative ribosomal protein S7	0.624
		putative asparaginyl-tRNA synthetase	0.623
		putative ribosomal protein I35a	0.616
		putative ribosomal protein L27	0.609
		putative ribosomal protein L15	0.601
		putative 60S ribosomal protein L5	0.601

Inside the mammalian host, *Leishmania* lives in the lethal enzymatic environment of macrophage cells, where they deal with the macrophage-generated oxidative stress to survive. Their survival is attributed to a unique redox metabolism with which the parasite has evolved. In the present study, the oxidoreductase activity of proteins that act on sulfur group donors was upregulated in atypical strains compared to typical strains. Our results show that in this process, five proteins were increased, represented mainly by trypanothione reductase (TR), with a

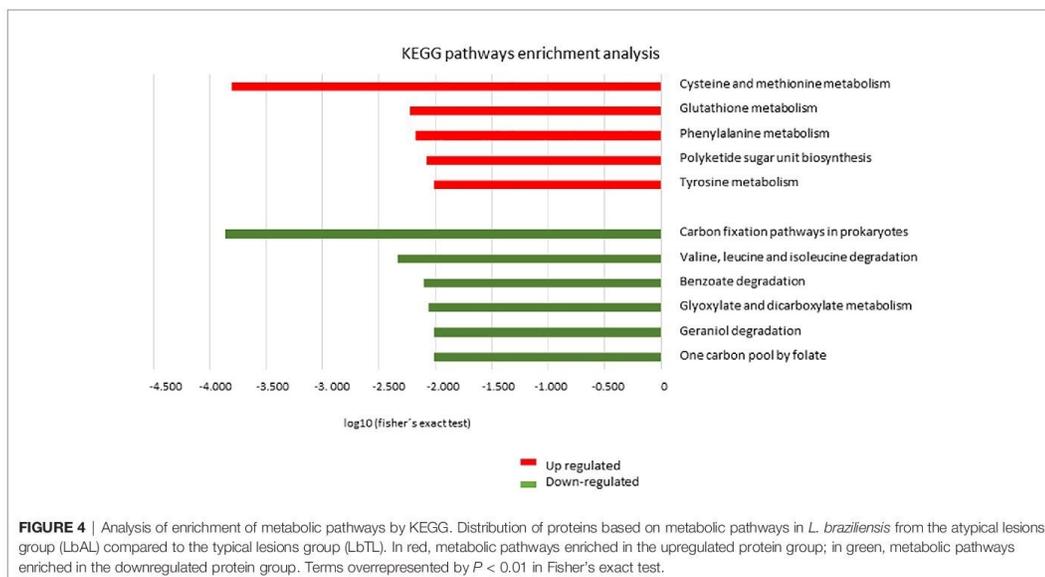
higher positive ratio (2.42) followed by peptide methionine sulfoxide reductase-like (Msr) (ratio =1.06). Both TR and Msr are proteins that catalyze reduction reactions and contribute to the antioxidant defenses of these parasites. TR is an enzyme found in trypanosomatids, equivalent to glutathione reductase. This enzyme is a homodimer NADPH-dependent flavoprotein oxidoreductase that participates in central thiol-disulfide exchange reactions as an electron donor in different metabolic pathways, from the synthesis of DNA precursors to oxidant



detoxification (Mittal et al., 2005; Colotti et al., 2013). TR neutralizes hydrogen peroxide produced by macrophages during infection through the trypanothione/trypanothione peroxidase I (TXN/TXNPx) system (Colotti et al., 2013). Therefore, TR inhibition increases the intracellular levels of reactive oxygen species that are lethal to the parasite. Similarly, Msr is a protein that catalyzes the reduction reaction, in this case, reducing oxidized methionine residues. Rodríguez-Veja et al. (2021) showed that strains of *L. braziliensis* related to disseminated leishmaniasis (DL) might also have a greater resistance to oxidative stress, mediated by the increased abundance of trypanothione reductase, and thioredoxin-like fold domain containing protein. Consistently, disruption of the trypanothione reductase gene decreases the *Leishmania* infectivity and its ability to survive within the macrophage. Thus, our results indicate that the parasites that cause atypical

lesions present increased abundance of some proteins related to redox homeostasis, which may confer greater survival inside macrophages.

Pentavalent antimony-containing compounds (sodium stibogluconate Pentostam® and N-methyl-glucamine Glucantime®) have been the first-line drugs for the treatment of all clinical forms of leishmaniasis since 1940 (Davidson, 1999), and as no human vaccine is in clinical use, chemotherapy relying on pentavalent antimonial still is the most important control for leishmaniasis. The mechanism of action of antimony has not been fully elucidated; however, SbIII (stibogluconate) is purported to generate disturbances in the thiol redox potential of the parasite by inducing the efflux of intracellular thiols and by inhibiting trypanothione reductase, resulting in cell death by oxidative stress (Wyllie et al., 2004). The antimony susceptibility test (EC 50 assay) revealed that *L. braziliensis* lines



overexpressing cytosolic trypanredoxin peroxidase (cTXNPx) had a 2-fold increase in resistance to SbIII compared to the untransfected parental line. Furthermore, these clones were more tolerant to exogenous H_2O_2 than the untransfected parental line (Moreira and Murta, 2016). Similarly, overexpression of nucleoside diphosphate kinase b and elongation factor 2 results in an increase in SbIII resistance in *L. braziliensis* (Andrade and Murta, 2014). Corroborating these literature data, the results of the present work, in which we used naturally-occurring antimony-resistant strains that cause AL, showed that these strains present upregulated reductase proteins (trypanothione reductase, thioredoxin, peptide methionine sulfoxide reductase-like, thiol-dependent reductase 1, nucleoside diphosphate kinase b, deoxyribose phosphate aldolase, and methylthioadenosine phosphorilase, which interact with each other (Figure 3). Some of these proteins also participate in glutathione metabolism (one of the enrichment pathways shown by the KEGG tool). Atypical strains showed 3.01-fold higher peroxidase activity than typical ones ($P < 0.001$, Figure 5). As already mentioned, the atypical strains used in present study were previously characterized as resistant to N-methylglucamine antimonate (Rugani et al., 2018) then, we believe that, collectively, it was possible to identify the proteins related to antimony resistance and prove the greater peroxidase activity in strains of the typical group. These data shed new light on ACL cases that have been associated with therapeutic failures.

Therefore, regarding MF, we observed enrichment of "Enzyme inhibitor activity" as upregulated terms in atypical strains, including the proteins ecotin, ecotin-like, and protein phosphatase inhibitor 2 (IPP-2). Ecotin is a serine protease inhibitor produced by hundreds of microbial species, including pathogens such as *Leishmania* spp. Parasites encode inhibitors of

serine protease (ISP), which inhibits serine proteases of the immune response system and manipulates the host physiological processes to ensure their survival. In *L. major*, ISP targets host serine peptidases and influences the early stages of infection of the mammalian host (Eschenlauer et al., 2009). Alam et al. (2016) identified, purified, and characterized an endogenous ISP from an Indian strain of *L. donovani*, which causes fatal visceral leishmaniasis, and these inhibitors show varying and entirely contrasting efficacies toward serine proteases of its own as well as of higher organisms. To that authors, this indicates that it accelerates disease progression and drives parasite survival by inhibiting the activities of host serine proteases. Subsequently, it was demonstrated that ecotin blocks activation of the complement lectin pathway by inhibiting its key activator enzymes, MASP-1 and MASP-2. Furthermore, by inhibiting MASP-3, ecotin also disrupts the fundamental link between lectin and alternative pathways. Thus, ecotin is a potent, versatile self-defense tool that blocks multiple antimicrobial activities in the serum. These findings suggest that ecotin may be a relevant antimicrobial drug target (Nagy et al., 2019). Thus, our data suggest that ecotin could be a new drug target to be tested in strains that are resistant to antimony, as already mentioned. Our data also showed positive regulation of protein phosphatase inhibitor 2 (IPP-2). Protein phosphorylation and dephosphorylation are well recognized as important processes that regulate multiple physiological mechanisms. To date, there are no reports on IPP-2 from *Leishmania*; nevertheless, it is a protein involved in the regulation of phosphoproteins and regulation of signal transduction that is able to impede the activity of a protein phosphatases, enzymes that hydrolyzes phosphate groups from phosphorylated proteins. Upregulation of phosphatase inhibitors consequently allows higher activity of

TABLE 3 | KEGG enriched pathways of differentially regulated proteins in *L. braziliensis* from atypical lesion (LbAL) compared to *L. braziliensis* from typical lesion (LbTL).

PATHWAY	PROTEINS	RATIO(LbAL vs LbTL)
UPREGULATED		
Cysteine and methionine metabolism	putative thymine-7-hydroxylase	1.456151
	FtsJ-like_methyltransferase	1.287025
	putative sterol 24-c-methyltransferase	0.814614
	putative methylthioadenosine phosphorylase	0.717098
	conserved hypothetical protein (134063540)	0.686384
	putative aspartate aminotransferase	0.679376
	putative branched-chain amino acid aminotransferase	0.639421
	tyrosine aminotransferase	0.627521
	putative arginine N-methyltransferase, type III	0.616916
	putative malate dehydrogenase	0.585591
Glutathione metabolism	trypanothione reductase	2.417349
	hypothetical protein, unknown function (322504762)	1.724753
	tryparedoxin_peroxidase	0.993897
	thiol-dependent_reductase_1	0.708709
	putative trypanothione synthetase	0.689669
	putative glutaredoxin-like protein	0.649122
Phenylalanine metabolism	FtsJ-like_methyltransferase	1.287025
	putative sterol 24-c-methyltransferase	0.814614
	conserved hypothetical protein (134063540)	0.686384
	putative aspartate aminotransferase	0.679376
	tyrosine aminotransferase	0.627521
	conserved hypothetical protein (134063845)	0.598311
Polyketide sugar unit biosynthesis	FtsJ-like_methyltransferase	1.287025
	putative sterol 24-c-methyltransferase	0.814614
	conserved hypothetical protein (134063540)	0.686384
	tyrosine aminotransferase	0.627521
	putative arginine N-methyltransferase, type III	0.616921
	putative lanosterol synthase	0.61456
Tyrosine metabolism	FtsJ-like_methyltransferase	1.287025
	putative sterol 24-c-methyltransferase	0.814614
	Acyltransferase	0.81126
	putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase	0.69938
	conserved hypothetical protein (134063540)	0.68638
	putative aspartate aminotransferase	0.67938
	tyrosine aminotransferase	0.62752
	putative arginine N-methyltransferase, type III	0.61692
	putative lanosterol synthase	0.61456
	DOWNREGULATED PROTEINS	
Carbon fixation pathways in prokaryotes	mitochondrial malate dehydrogenase	-1.1499
	glycosomal malate dehydrogenase	-0.94403
	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0.82537
	formate—tetrahydrofolate ligase	-0.81918
	methylcrotonoyl-coa carboxylase biotinylated subunitprotein-like protein	-0.68285
	putative C-1-tetrahydrofolate synthase,cytoplasmic	-0.65468
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein,conserved	-0.62284
	mitochondrial DNA topoisomerase II	-0.60924
	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0.82537
	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	-0.69571
	methylcrotonoyl-coa carboxylase biotinylated subunitprotein-like protein	-0.68285
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein,conserved	-0.62284
	mitochondrial DNA topoisomerase II	-0.60924
	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0.82537
	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	-0.69571
Valine, leucine and isoleucine degradation	methylcrotonoyl-coa carboxylase biotinylated subunitprotein-like protein	-0.68285
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein,conserved	-0.62284
	mitochondrial DNA topoisomerase II	-0.60924
	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0.82537
	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	-0.69571
	methylcrotonoyl-coa carboxylase biotinylated subunitprotein-like protein	-0.68285
Benzoate degradation	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein,conserved	-0.62284
	mitochondrial DNA topoisomerase II	-0.60924
	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0.82537
	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	-0.69571
	methylcrotonoyl-coa carboxylase biotinylated subunitprotein-like protein	-0.68285
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein,conserved	-0.62284
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	mitochondrial malate dehydrogenase	-1.1499
	glycosomal malate dehydrogenase	-0.94403
	methylcrotonoyl-coa carboxylase biotinylated subunitprotein-like protein	-0.68285
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein,conserved	-0.62284
	mitochondrial DNA topoisomerase II	-0.60924
	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0.82537
Geraniol degradation	mitochondrial malate dehydrogenase	-1.1499
	glycosomal malate dehydrogenase	-0.94403

(Continued)

TABLE 3 | Continued

PATHWAY	PROTEINS	RATIO(LbAL vs LbTL)
One carbon pool by folate	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	-0.69571
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein, conserved	-0.62284
	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-0.82537
	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	-0.69571
	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein, conserved	-0.62284

In bold proteins that are in more than one pathway, proteins sorted by log2-ratio.

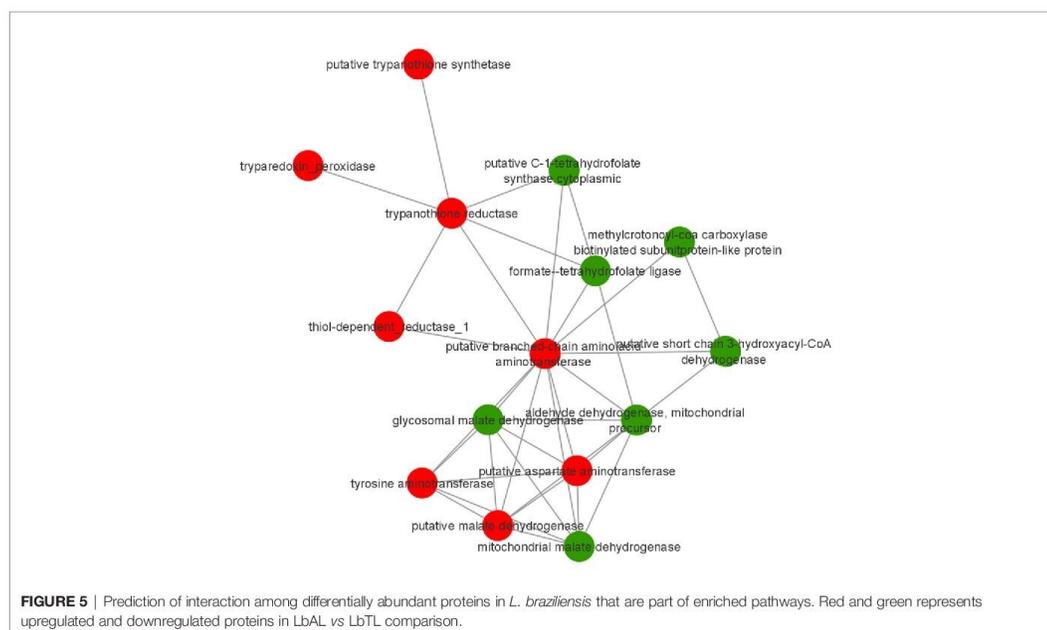


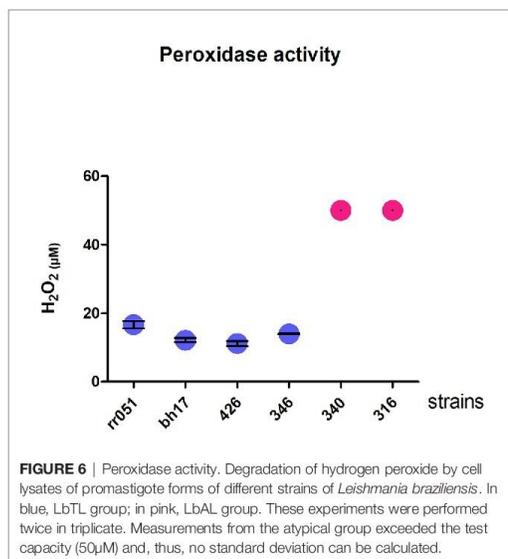
FIGURE 5 | Prediction of interaction among differentially abundant proteins in *L. braziliensis* that are part of enriched pathways. Red and green represents upregulated and downregulated proteins in LbAL vs LbTL comparison.

phosphorylated proteins, which are associated with diverse cellular functions, including glycolysis, motility, mitosis, apoptosis, cell cycle progression, and signal transduction (Qureshi et al., 2019).

A clustering of several ribosomal proteins interacting with each other was observed with BP enrichment of 12 (from 27) ribosomal proteins, of which 9 interact with each other and all of which are positively regulated in strains from atypical lesions. Eukaryotic ribosomes have approximately 70 proteins, 30 of which are present in the smaller sub-unit and 40 in the larger sub-unit (Tsurugi et al., 1978), therefore, suggesting that 12 regulated proteins may not be related to increased ribosomal activity; however, in *Leishmania* spp., ribosome-related proteins have been considered relevant molecules during infection and have been shown to modulate cellular activity and cytokine release (Cordeiro-Da-Silva et al., 2001). Therefore, they are good candidates for vaccination (Iborra et al., 2008; Brito et al., 2017). These ribosomal proteins could be associated with immune response modulation, favorable to the parasites from

atypical strains which the disease duration was significantly longer among ACL individual as reported in Guimarães et al. (2016).

Our results also demonstrate negative regulation of the oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors, as well as acting on a sulfur group of donors, disulfide as an acceptor, groups represented mainly by malate dehydrogenase and choline dehydrogenase in atypical strains compared to typical strains. In this case, the higher negative ratios were malate dehydrogenase (-1.15) and choline dehydrogenase (-1.06). Furthermore, these categories included several downregulated dehydrogenases (malate dehydrogenase, choline dehydrogenase, dehydrogenase-like protein, short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and aldehyde dehydrogenase) that interact with each other (Figure 3). Dehydrogenases are oxidoreductase enzymes that catalyze the transfer of hydrogen and a pair of electrons from a reduced substrate, which is oxidized in the reaction, to an electron-receiving molecule, which in turn, is reduced. In higher eukaryotes, mitochondrial MDH (mMDH) is involved in the



transfer of reducing equivalents from the cytosol to the mitochondria, which is essential for the activity of the glycolytic pathway in the cytosol. MDH has been demonstrated in *Leishmania* over 20 years ago (Mottram and Coombs, 1985), although the metabolic roles of MDH isozymes in trypanosomatids have not yet been clearly established. Leroux et al. (2006) demonstrated the presence of three MDH isoforms with slightly distinct biochemical properties and different subcellular localizations (mitochondrial and cytosolic) in *Leishmania* spp., and verified that these isozymes are remarkably more abundant in amastigotes than in promastigotes of *L. mexicana*. These authors presumed that the functional and biochemical features of these isozymes reflect the metabolic adaptation to the different nutrient sources that these parasites have to face during their life cycle. In *L. braziliensis*, MDH was inferred from homology; however, consistent with the present work, de Rezende et al. (2017) found MDH in *L. amazonensis*. Similarly, the presence of choline dehydrogenase in *Leishmania* spp. was inferred from homology. Thus, to date, no reports are available for experimental activity data involving malate dehydrogenase and choline dehydrogenase in *Leishmania* spp., and it is possible to speculate the role of these enzymes in relation to the strains studied in the present work.

Another negative regulation observed in atypical strains was related to serine/threonine kinase activity by the putative target proteins of rapamycin (TOR) and kinase 1 protein kinase. Initially, TORs were identified by mutations that confer resistance to a potent antifungal metabolite called rapamycin (Heitman et al., 1991). TOR kinases are key master regulators in eukaryotes, linking environmental conditions, such as nutrient availability and stimuli, to protein synthesis and cell cycle machinery in order to coordinate cell growth and replication. *Leishmania* TOR mutants were unable to survive or replicate in macrophages *in vitro* or to induce

pathology or establish infections in mice *in vivo*. The loss of virulence is associated with a defect in acidocalcisome formation, a unique organelle of protozoans that plays an important role in energy metabolism (Madeira da Silva and Beverley, 2010). Based on these data, the downregulation of TOR in atypical strains could confer less virulence to this strain compared to typical strains; however, only one protein is not sufficient to determine virulence. Thus, we cannot infer the role of regulation of this protein in the strains studied. Similarly, the downregulation of kinase 1 protein alone is very difficult to speculate because it belongs to an important family of proteins. A number of studies have explored the role of individual *Leishmania* protein kinases in promastigote survival, metacyclic differentiation, and amastigote replication, as well as their role in infectivity. Baker et al. (2021) identified regulators of differentiation or survival in a systematic functional analysis of *Leishmania* protein kinases. They applied kinome-wide gene deletion and gene tagging in *L. mexicana* promastigotes to define protein kinases with life cycle transition roles. While 162 are dispensable, 44 protein kinase genes are refractory to deletion in promastigotes and are likely core genes required for parasite replication. Therefore, to understand the role of this molecular function and its downregulated proteins, further studies are needed on the strains used in the present work.

The results presented here show that promastigotes from *L. braziliensis* strains isolated from atypical and typical lesions have proteins with different abundances. The comparison between these strains enabled the reproducible identification of several proteins that distinguish the two groups. Strains isolated from atypical forms showed an upregulation of proteins which may confer greater survival inside macrophages, proteins that influence the early stages of infection of the mammalian host (ISP), and proteins associated with resistance to antimony therapy. Moreover, peroxidase activity was 3.01-fold higher in the atypical strains than in the typical strains.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repository and accession number(s) can be found below: <https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/>, PXD029995.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BE: Data Curation, formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – Original Draft Preparation. MM-B: conceptualization, Methodology, Supervision, Writing – Review & Editing. VG: Methodology, Writing – Review & Editing. TV-B: conceptualization, Methodology, Writing – Review & Editing. ML: conceptualization, Methodology, Writing – Review & Editing. CG: conceptualization, Writing – Review & Editing. PQ: conceptualization, Methodology, Writing – Review & Editing. HA: conceptualization, funding acquisition, Methodology, Project

administration, resources, Supervision, Writing – Review & Editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This research was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais [PPM00129-17], Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas [CNPq-573547/2008-4/FAPEMIG/MS-CBB, APQ 00077-09] and Rede Mineira de Biomoléculas [CCBRED00012-14]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. HA is CNPq fellows (PQ). BE and MM-B are CAPES fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Alam, M. N., Das, P., De, T., and Chakraborti, T. (2016). Identification and Characterization of a Leishmania Donovanii Serine Protease Inhibitor: Possible Role in Regulation of Host Serine Proteases. *Life Sci.* 144, 218–225. doi: 10.1016/j.lfs.2015.12.004
- Andrade, J. M., and Murta, S. M. (2014). Functional Analysis of Cytosolic Trypanredoxin Peroxidase in Antimony-Resistant and -Susceptible Leishmania Braziliensis and Leishmania Infantum Lines. *Parasit. Vectors* 7, 406. doi: 10.1186/1756-3305-7-406
- Baker, N., Catta-Preta, C. M. C., Neish, R., Sadlova, J., Powell, B., Alves-Ferreira, E. V. C., et al. (2021). Systematic Functional Analysis of Leishmania Protein Kinases Identifies Regulators of Differentiation or Survival. *Nat. Commun.* 12 (1), 1244. doi: 10.1038/s41467-021-21360-8
- Baptista, C., Schubach, A. O., Madeira, M. F., Leal, C. A., Pires, M. Q., Oliveira, F. S., et al. (2009). Leishmania (Viannia) Braziliensis Genotypes Identified in Lesions of Patients With Atypical or Typical Manifestations of Tegumentary Leishmaniasis: Evaluation by Two Molecular Markers. *Exp. Parasitol.* 121 (4), 317–322. doi: 10.1016/j.exppara.2008.12.006
- Brito, R. C., Guimarães, F. G., Velloso, J. P., Corrêa-Oliveira, R., Rui, J. C., Reis, A. B., et al. (2017). Immunoinformatics Features Linked to Leishmania Vaccine Development: Data Integration of Experimental and *In Silico* Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2), 371. doi: 10.3390/ijms18020371
- Calvopina, M., Gomez, E. A., Uezato, H., Kato, H., Nonaka, S., and Hashiguchi, Y. (2005). Atypical Clinical Variants in New World Cutaneous Leishmaniasis: Disseminated, Erysipeloid, and Recidiva Cutis Due to Leishmania (V.) Panamensis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73 (2), 281–284. doi: 10.4269/ajtmh.2005.73.281
- Colotti, G., Baiocco, P., Fiorillo, A., Boffi, A., Poser, E., Chiaro, F. D., et al. (2013). Structural Insights Into the Enzymes of the Trypanothione Pathway: Targets for Antileishmaniasis Drugs. *Future Med. Chem.* 5, 1861–1875. doi: 10.4155/fmc.13.146
- Cordeiro-Da-Silva, A., Borges, M. C., Guilvard, E., and Ouassii, A. (2001). Dual Role of the Leishmania Major Ribosomal Protein S3a Homologue in Regulation of T- and B-Cell Activation. *Infect. Immun.* 69 (11), 6588–6596. doi: 10.1128/IAI.69.11.6588-6596.2001
- Costa-Silva, M. F., Gomes, L. L., Martins-Filho, O. A., Rodrigues-Silva, R., de Moura Freire, J., Quaresma, P. F., et al. (2014). Gene Expression Profile of Cytokines and Chemokines in Skin Lesions From Brazilian Indians With Localized Cutaneous Leishmaniasis. *Mol. Immunol.* 57 (2), 74–85. doi: 10.1016/j.molimm.2013.08.008
- Cupolillo, E., Grimaldi, G. Jr., and Momen, H. (1994). A General Classification of New World Leishmania Using Numerical Zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 (3), 296–311. doi: 10.4269/ajtmh.1994.50.296

ACKNOWLEDGMENTS

We also would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.824968/full#supplementary-material>

Supplementary Table S1 | All proteins identified by MS/MS.

Supplementary Table S2 | Proteins identified by MS/MS in each run with abundance increased in Atypical (LbAL) strains compared to Typical (LbTL) strains.

Supplementary Table S3 | Proteins identified by MS/MS in each run with abundance decreased in Atypical (LbAL) strains compared to Typical (LbTL) strains.

- Da-Cruz, A. M., Filgueiras, D. V., Coutinho, Z., Mayrink, W., Grimaldi, G. Jr., De Luca, P. M., et al. (1999). Atypical Mucocutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania Braziliensis in an Acquired Immunodeficiency Syndrome Patient: T-Cell Responses and Remission of Lesions Associated With Antigen Immunotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 94 (4), 537–542. doi: 10.1590/S0074-02761999000400020
- Davidson, R. N. (1999). Visceral Leishmaniasis in Clinical Practice. *J. Infect.* 39 (2), 112–116. doi: 10.1016/s0163-4453(99)90001-4
- de Rezende, E., Kawahara, R., Peña, M. S., Palmisano, G., and Stolf, B. S. (2017). Quantitative Proteomic Analysis of Amastigotes From Leishmania (L.) amazonensis LV79 and PH8 Strains Reveals Molecular Traits Associated With the Virulence Phenotype. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (11), e0006090. doi: 10.1371/journal.pntd.0006090
- Eschenlauer, S. C., Faria, M. S., Morrison, L. S., Bland, N., Ribeiro-Gomes, F. L., DosReis, G. A., et al. (2009). Influence of Parasite Encoded Inhibitors of Serine Peptidases in Early Infection of Macrophages With Leishmania Major. *Cell. Microbiol.* 11 (1), 106–120. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01243.x
- Fialho Junior, L., da Fonseca Pires, S., Burchmore, R., McGill, S., Weidt, S., Ruiz, J. C., et al. (2021). Proteomic Analysis Reveals Differentially Abundant Proteins Probably Involved in the Virulence of Amastigote and Promastigote Forms of Leishmania Infantum. *Parasitol. Res.* 120, 679–692. doi: 10.1007/s00436-020-07020-8
- Guimarães, L. H., Machado, P. R., Lago, E. L., Morgan, D. J., Schriefer, A., Bacellar, O., et al. (2009). Atypical Manifestations of Tegumentary Leishmaniasis in a Transmission Area of Leishmania Braziliensis in the State of Bahia, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hygiene* 103 (7), 712–715. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.04.019
- Guimarães, L. H., Queiroz, A., Silva, J. A., Silva, S. C., Magalhães, V., Lago, E. L., et al. (2016). Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for Leishmania Braziliensis: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. *PLoS Negl Trop. Dis.* 10 (12), e0005100. doi: 10.1371/journal.pntd.0005100
- Heitman, J., Movva, N. R., and Hall, M. N. (1991). Targets for Cell Cycle Arrest by the Immunosuppressant Rapamycin in Yeast. *Sci.* 253 (5022), 905–909. doi: 10.1126/science.1715094
- Iborra, S., Parody, N., Abánades, D. R., Bonay, P., Prates, D., Novais, F. O., et al. (2008). Vaccination With the Leishmania Major Ribosomal Proteins Plus Cpg Oligodeoxynucleotides Induces Protection Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis in Mice. *Microbes Infect.* 10 (10–11), 1133–1141. doi: 10.1016/j.micinf.2008.06.002
- Iftikhar, N., Bari, I., and Ejaz, A. (2003). Rare Variants of Cutaneous Leishmaniasis: Whitlow, Paronychia, and Sporotrichoid. *Int. J. Dermatol.* 42 (10), 807–809. doi: 10.1046/j.1365-4362.2003.02015.x
- Jiang, Q., Yan, Y., Hu, G., and Zhang, Y. (2005). Molecular Cloning and Characterization of a Peroxiredoxin From Phlebotomus Chrysosporium. *Cell Mol. Biol. Lett.* 10, 659–668.

- Karıncaoğlu, Y., Esrefoglu, M., and Özcan, H. (2004). Atypical Clinical Form of Cutaneous Leishmaniasis: Erysipeloid Form. *Int. J. Dermatol.* 43 (11), 827–829. doi: 10.1111/j.1365-4632.2004.02324.x
- Lainson, R., and Shaw, J. J. (1998). "New World Leishmaniasis - Neotropical Leishmania Species" In: Cox, F.E., Kreier, J.P., and Wakelin, D., editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9th ed. London: Hodder Headline Group, p. 241–266.
- Leroux, A., Fleming-Canepa, X., Aranda, A., Maugeri, D., Cazzulo, J. J., Sánchez, M. A., et al. (2006). Functional Characterization and Subcellular Localization of the Three Malate Dehydrogenase Isozymes in *Leishmania* Spp. *Mol. Biochem. Parasitol.* 149 (1), 74–85. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.04.010
- Madeira da Silva, L., and Beverley, S. M. (2010). Expansion of the Target of Rapamycin (TOR) Kinase Family and Function in *Leishmania* Shows That TOR3 is Required for Acidocalcisome Biogenesis and Animal Infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (26), 11965–11970. doi: 10.1073/pnas.1004599107
- Mittal, M. K., Misra, S., Owais, M., and Goyal, N. (2005). Expression, Purification, and Characterization of *Leishmania* Donovanii Trypanothione Reductase in *Escherichia Coli*. *Protein Expr. Purif.* 40 (2), 279–286. doi: 10.1016/j.pep.2004.12.012
- Moreira, D. S., and Murta, S. M. (2016). Involvement of Nucleoside Diphosphate Kinase B and Elongation Factor 2 in *Leishmania* Braziliensis Antimony Resistance Phenotype. *Parasit. Vectors* 9 (1), 641. doi: 10.1186/s13071-016-1930-6
- Mottram, C., and Coombs, G. H. (1985). Purification of Particulate Malate Dehydrogenase and Phosphoenol Pyruvate Carboxykinase From *Leishmania Mexicana Mexicana*. *Biochem. Biophys. Acta* 827 pp, 310–319. doi: 10.1016/0167-4838(85)90216-x
- Nagy, Z. A., Szakács, D., Boros, E., Héja, D., Vígh, E., Sándor, N., et al. (2019). Ecotin, a Microbial Inhibitor of Serine Proteases, Blocks Multiple Complement Dependent and Independent Microbicidal Activities of Human Serum. *PLoS Pathog.* 15 (12), e1008232. doi: 10.1371/journal.ppat.1008232
- Negrão, F., Diedrich, J. K., Giorgio, S., Eberlin, M. N., and Yates, J. R.3rd. (2019). Tandem Mass Tag Proteomic Analysis of *In Vitro* and *In Vivo* Models of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Parasite-Specific and Nonspecific Modulation of Proteins in the Host. *ACS Infect. Dis.* 5 (12), 2136–2147. doi: 10.1021/acinfecdis.9b00275
- Omidian, M., and Mapar, M. A. (2006). Chronic Zosteriform Cutaneous Leishmaniasis. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 72 (1), 41–42. doi: 10.4103/0378-6323.19717
- Patino, L. H., Imamura, H., Cruz-Saavedra, L., Pavia, P., Muskus, C., Mendez, C., et al. (2019a). Major Changes in Chromosomal Somy, Gene Expression and Gene Dosage Driven by Sb(III) in *Leishmania* Braziliensis and *Leishmania Panamensis*. *Sci. Rep.* 9, 9485. doi: 10.1038/s41598-019-45538-9
- Pawar, H., Sathe, G., and Patole, M. S. (2020). Genome-Wide Proteomics and Phosphoproteomics Analysis of *Leishmania* Spp. During Differentiation. *Methods Mol Biol.* 2116, 161–176. doi: 10.1007/978-1-0716-0294-2_12
- Polpitiya, A. D., Wei-Jun, Q., Navdeep, J., Vladislav, A. P., Joshua, N. A., David, G. C.II, et al. (2008). Dante: A Statistical Tool for Quantitative Analysis of -Omics Data. *Bioinf.* 24 (13), 1556–1558. doi: 10.1093/bioinformatics/btn217
- Quaresma, P. F., de Brito, C. F. A., Rugani, J. M. N., Freire, J. M., Baptista, R. P., Moreno, E. C., et al. (2018). Distinct Genetic Profiles of *Leishmania* (Viannia) Braziliensis Associate With Clinical Variations in Cutaneous-Leishmaniasis Patients From an Endemic Area in Brazil. *Parasitology* 145 (9), 1161–1169. doi: 10.1017/S0031182018000276
- Qureshi, R., Jakkula, P., Sagurthi, S. R., and Qureshi, I. A. (2019). Protein Phosphatase 1 of *Leishmania* Donovanii Exhibits Conserved Catalytic Residues and Pro-Inflammatory Response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 516 (3), 770–776. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.06.085
- Rego, F. D., Da Rocha Lima, A., Pereira, A. A. S., Quaresma, P. F., Pascoal-Xavier, M. A., Shaw, J. J., et al. (2018). Genetic Variant Strains of *Leishmania* (Viannia) Braziliensis Exhibit Distinct Biological Behaviors. *Parasitol. Res.* 117, 3157–3168. doi: 10.1007/s00436-018-6014-4
- Rodriguez-Veja, A., Losada-Barragán, M., Berbert, L. R., Mesquita-Rodrigues, C., Bombaca, A. C. S., Menna-Barreto, R., et al. (2021). Quantitative Analysis of Proteins Secreted by *Leishmania* (Viannia) Braziliensis Strains Associated to Distinct Clinical Manifestations of American Tegumentary Leishmaniasis. *J. Proteomics* 232, 104077. doi: 10.1016/j.jprot.2020.104077
- Rugani, J. N., Gontijo, C. M. F., Frézard, F., Soares, R. P., and Monte-Neto, R. L. D. (2019). Antimony Resistance in *Leishmania* (Viannia) Braziliensis Clinical Isolates From Atypical Lesions Associates With Increased ARM56/ARM58 Transcripts and Reduced Drug Uptake. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 114, e190111. doi: 10.1590/0074-02760190111
- Tsurugi, K., Collatz, E., Todokoro, K., Ulbrich, N., Lightfoot, H. N., and Wool, I. G. (1978). Isolation of Eukaryotic Ribosomal Proteins. Purification and Characterization of the 60 s Ribosomal Subunit Proteins La, Lb, Lf, P1, P2, L13', L14, L18', L20, and L38. *J. Biol. Chem.* 253 (3), 946–955. doi: 10.1016/S0021-9258(17)38196-6
- Wyllie, S., Cunningham, M. L., and Fairlamb, A. H. (2004). Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol, Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania* Donovanii. *J. Biol. Chem.* 279, 39925–39932. doi: 10.1074/jbc.M405635200

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Esteves, Melo-Braga, Gorshkov, Verano-Braga, Larsen, Gontijo, Quaresma and Andrade. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Material suplementar

As tabelas suplementares estão disponíveis no link

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.824968/full#supplementary-material>

Tabela suplementar S1:

Todas as proteínas identificadas por LC-MS/MS (Ver link acima).

Tabela suplementar S2:

Proteínas identificadas por LC-MS/MS em cada *set* com abundância aumentada em cepas Atípicas (LbAL) em comparação com cepas Típicas (LbTL).

Tabela suplementar S3:

Proteínas identificadas por LC-MS/MS em cada *set* com abundância diminuída em cepas Atípicas (LbAL) em comparação com cepas Típicas (LbTL).

Tabela suplementar S2:

Protein ID	Description	Rep.1	Rep2	Rep.3	Ratio LbAL vs LbTL	pval
2852437	acidic ribosomal P2 beta protein	x	x	x	0,769	0,049
134058788	putative thioredoxin	NA	x	x	0,984	0,035
134059021	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	0,986	0,011
134059170	trypanothione reductase	x	x	x	2,417	0,000
134059213	MYND zinc finger (ZnF) domain-like protein	NA	x	x	0,682	0,014
134059442	putative 60S ribosomal protein L7a	x	x	x	0,624	0,000
134059490	RNA binding protein-like protein	x	x	x	0,781	0,008
134059554	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,623	0,045
134059820	hypothetical protein, unknown function	x	x	NA	0,723	0,019
134059980	hypothetical protein, unknown function	x	x	x	0,685	0,000
134059988	putative cytochrome b5	x	x	x	0,697	0,020
134060010	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,677	0,003
134060069	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,852	0,039
134060333	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,754	0,019
134060620	conserved hypothetical protein	NA	x	x	0,960	0,044
134060738	conserved hypothetical protein	NA	x	x	1,149	0,006
134060761	putative cytochrome c	x	x	x	0,591	0,012
134060814	hypothetical protein, unknown function	x	x	x	0,706	0,002
134060949	putative otubain	x	x	x	0,750	0,004
134061007	putative tubulin-specific chaperone	x	x	x	0,606	0,006
134061220	conserved hypothetical protein	x		NA	1,170	0,042
134061324	putative malate dehydrogenase	x	x	x	0,586	0,026
134061404	putative 60S ribosomal protein L13a	x	x	x	0,712	0,046
134061480	conserved hypothetical protein	x	x	x	1,278	0,037
134061501	putative asparaginyl-tRNA synthetase	x	x	x	0,623	0,000
134061588	conserved hypothetical protein	NA	x	x	1,194	0,001
134061637	conserved hypothetical protein	x	x	x	1,211	0,000
134061761	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	0,923	0,013
134061801	vacuolar sorting-associated-like protein	x	x	x	0,903	0,005
134061822	putative dual specificity protein phosphatase	NA	x	x	0,995	0,029
134062054	putative small nuclear ribonucleoprotein	x	x	x	0,647	0,016
134062227	hypothetical protein, unknown function	x	x	NA	1,542	0,009
134062245	putative coronin	x	x	x	0,654	0,008
134062334	putative ATPase domain protein	x		NA	2,274	0,014
134062581	conserved hypothetical protein	x	x	NA	0,810	0,026
134062725	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,707	0,047
134062878	putative 10 kDa heat shock protein	x	x	x	2,018	0,000
134062953	guanine nucleotide-binding protein-like protein	NA	x	x	0,631	0,009
134063005	conserved hypothetical protein	x	x	x	1,092	0,001
134063058	conserved hypothetical protein	x	x	x	1,035	0,022
134063106	putative flap endonuclease-1 (FEN-1)	x	x	NA	0,780	0,023
134063220	putative arginyl-tRNA synthetase	x	x	x	0,669	0,000
134063463	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,781	0,011
134063502	putative haloacid dehalogenase-like hydrolase	x	x	x	0,721	0,007
134063517	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,762	0,040
134063540	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,686	0,008
134063547	conserved hypothetical protein	x	x	x	1,201	0,047
134063561	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,874	0,017

134063708	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,662	0,028
134063724	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,939	0,038
134063791	tryparedoxin	x	x	x	1,015	0,016
134063845	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,598	0,023
134064035	putative 40S ribosomal protein S30	x	x	NA	1,041	0,036
134064373	putative amino acid transporter aATP11	x	x	x	0,726	0,024
134064447	conserved hypothetical protein	x		NA	0,672	0,023
134064527	amino acid permease	x	x	x	0,726	0,020
134064632	hypothetical protein, unknown function	x	x	x	0,725	0,000
134064815	putative histone H2A	x	x	x	0,659	0,032
134064979	putative ribosomal protein L27	x	x	x	0,609	0,001
134065004	nucleoside diphosphate kinase b	x	x	x	1,072	0,026
134065080	putative enolase	x		NA	1,831	0,003
134065225	conserved hypothetical protein	NA	x	x	1,414	0,024
134065442	conserved hypothetical protein	NA	x	x	0,695	0,025
134065575	hypothetical protein, unknown function	NA	x	x	0,606	0,020
134065724	conserved hypothetical protein	x		NA	1,010	0,004
134065851	conserved hypothetical protein	NA	x	x	0,968	0,026
134065980	stress-inducible protein STI1 homolog	x	x	x	0,669	0,001
134065981	histone H4	x		x	1,040	0,048
134066046	conserved hypothetical protein	x		NA	1,002	0,000
134066079	conserved hypothetical protein	NA	x	x	1,003	0,014
134066111	putative adenylate kinase	NA	x	x	0,637	0,028
134066350	nudix hydrolase-like protein	NA	x	x	1,084	0,040
134066400	transcription factor S-II-like protein	NA	x	x	0,733	0,025
150382238	RecName: Full=Ecotin-like protein 2	x	x	x	0,797	0,025
154331073	putative 60S ribosomal protein L19	x	x	x	0,708	0,028
154331157	putative arginine N-methyltransferase, type III	x	x	x	0,617	0,000
154331313	putative acidocalcisomal exopolyphosphatase	x	x	x	0,900	0,010
154331337	putative ribosomal protein S7	x	x	x	0,624	0,020
154331456	conserved hypothetical protein	x	x	x	1,158	0,011
154331494	hypothetical protein, unknown function	x	x	x	0,786	0,012
154331792	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,736	0,018
154332155	putative methylthioadenosine phosphorylase	x	x	x	0,717	0,001
154332235	protein phosphatase type 1 regulator-like protein	x	x	x	0,633	0,000
154332458	putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/rotamase	x	x	x	1,146	0,001
154332555	iron superoxide dismutase	x	x	x	1,233	0,000
154332854	putative prefoldin subunit 2	x	x	x	0,630	0,028
154332902	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,891	0,009
154333029	phosphate-Repressible Phosphate Permease-like protein	x	x	x	1,055	0,020
154333037	putative ribosomal protein l35a	x	x	NA	0,616	0,030
154333093	putative folate/biopterin transporter	x	x	NA	0,825	0,004
154333448	conserved hypothetical protein	NA	x	x	1,094	0,045
154333472	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,597	0,038
154333510	adaptin-related protein-like protein	x	x	x	0,786	0,001
154334040	conserved hypothetical protein	NA	x	x	0,947	0,036
154334091	conserved hypothetical protein	x	x	NA	0,619	0,022
154334345	conserved hypothetical protein	NA	x	x	0,862	0,016

154334837	conserved hypothetical protein	NA	x	x	0,767	0,012
154335025	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,601	0,018
154335479	putative uracil-DNA-glycosylase	NA	x	x	0,751	0,037
154335547	putative DNA-directed RNA polymerase II	NA	x	x	1,342	0,024
154336008	conserved hypothetical protein	NA	x	x	1,852	0,026
154337772	putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase	x	x	x	0,699	0,005
154337912	hypothetical protein, unknown function	x	x	x	0,922	0,036
154338205	hypothetical protein, unknown function	NA	x	NA	1,213	0,017
154338463	hypothetical predicted multi-pass transmembrane protein	x	x	x	0,967	0,008
154338942	conserved hypothetical protein	x	x	x	1,119	0,001
154339846	conserved hypothetical protein	x	x	NA	1,003	0,006
154339996	putative trypanothione synthetase	x	x	x	0,690	0,001
154340034	putative branched-chain amino acid aminotransferase	x	x	x	0,639	0,005
154340605	conserved hypothetical protein	x	x	NA	0,941	0,001
154340840	conserved hypothetical protein	NA	x	x	0,645	0,014
154340880	cofilin-like protein	x	x	x	0,936	0,001
154340892	putative thymine-7-hydroxylase	x	x	x	1,456	0,000
154340988	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,649	0,007
154341246	putative aspartyl aminopeptidase	x	x	x	0,843	0,000
154341493	putative spliceosome-associated protein	x	x	x	0,754	0,005
154341663	putative amal protein	x	x	x	3,376	0,000
154341803	conserved hypothetical protein	x		NA	0,946	0,032
154341807	hypothetical protein, unknown function	x	x	x	1,234	0,019
154341831	putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor	NA	NA	x	0,603	0,033
154342122	conserved hypothetical protein	x	x	x	1,258	0,005
154342444	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,650	0,048
154342893	putative serine/threonine-protein kinase	NA	x	x	1,150	0,012
154342915	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,593	0,004
154343205	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,646	0,001
154344491	putative proteasome activator protein pa26	x	x	x	1,256	0,002
154344503	putative aspartate aminotransferase	x	x	x	0,679	0,011
154344697	putative 60S ribosomal protein L5	x	x	x	0,601	0,000
154344699	putative ribosomal protein L15	NA	x	x	0,601	0,008
154344715	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,622	0,002
154344727	60S ribosomal protein L32	x	x	x	1,357	0,009
154345113	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,828	0,002
154345275	putative proteasome alpha 1 subunit	x	x	x	0,799	0,003
154345556	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	4,294	0,000
154345724	putative poly-zinc finger protein 2	x	x	x	0,622	0,006
154345732	putative universal minicircle sequence binding protein (UMSBP)	x	x	x	1,354	0,000
154345844	putative ER--golgi transport protein erv25 precursor	x	x	x	0,718	0,043
154345882	tyrosine aminotransferase	x	x	x	0,628	0,024
154345982	40S ribosomal protein S24e	x	x	x	1,398	0,038
154346070	conserved hypothetical protein	x	x	x	1,340	0,000
154346134	conserved hypothetical protein	x	x	x	1,175	0,019
154346164	putative 60S ribosomal protein L10a	x	x	x	1,807	0,019

154346304	putative chaperone protein DNAj	x	x	x	0,597	0,009
154346428	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,618	0,000
154346608	conserved hypothetical protein	x	x	NA	0,885	0,000
154346648	putative lmg2, partial	x	x	x	0,818	0,019
289066233	70 kDa heat shock protein, partial	NA	x	x	1,126	0,025
322504269	putative lanosterol synthase	x	x	x	0,615	0,009
322504493	putative 60S acidic ribosomal protein	x	x	x	1,048	0,003
322504542	conserved hypothetical protein	NA	x	x	0,792	0,019
322504616	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	0,777	0,044
322504704	conserved hypothetical protein	x	x	x	1,047	0,042
322504762	hypothetical protein, unknown function	NA	x	x	1,725	0,011
322504774	hypothetical protein LBRM_20_4820	x	x	x	0,646	0,004
322504796	putative ATP-dependent RNA helicase	NA	x	NA	1,229	0,029
322504826	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	0,705	0,043
322504890	serine peptidase	NA	x	NA	0,616	0,023
322504972	putative ATP-dependent DEAD/H RNA helicase	x	x	x	0,678	0,014
322504990	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,608	0,001
322505054	putative ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	NA	x	x	1,041	0,021
322505174	putative glutaredoxin-like protein	x	x	x	0,649	0,029
322505290	conserved hypothetical protein	NA	x	x	1,053	0,034
322505360	cyclosome subunit-like protein	x		NA	0,981	0,010
322505442	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,821	0,001
322505624	putative expression-site associated gene (ESAG3)	x		NA	0,596	0,037
322505694	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,835	0,038
322505783	conserved hypothetical protein	NA	NA	x	0,900	0,050
386363685	Heat-shock protein 70 kDa, partial	x	x	x	1,825	0,012
389600041	putative protein kinase	x		NA	1,001	0,007
389600120	conserved hypothetical protein	NA	x	x	0,845	0,020
389600239	putative CYC2-like cyclin	NA	x	x	1,729	0,024
389600383	conserved hypothetical protein	NA	x	x	1,287	0,033
389600449	putative folate/biopterin transporter	NA	x	x	0,860	0,005
389600481	conserved hypothetical protein	x	x	x	0,597	0,049
389600518	conserved hypothetical protein	NA	x	x	1,412	0,012
389600581	conserved hypothetical protein	NA	x	x	0,954	0,035
389600748	hypothetical protein, unknown function	NA	x	x	1,076	0,004
389601495	cyclophilin a	x	x	x	0,806	0,004
389601632	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	1,603	0,006
389602072	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	0,765	0,047
389602092	conserved hypothetical protein	x	x	x	1,602	0,003
389603012	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	0,586	0,036
389603258	guanylate kinase-like protein	x		NA	1,910	0,014
389603260	putative sterol 24-c-methyltransferase	x	x	x	0,815	0,043
389603782	putative kinesin heavy chain	NA	x	x	1,756	0,031
389603834	conserved hypothetical protein	NA	x	x	0,589	0,033
449310630	universal minicircle sequence binding protein	x	x	x	1,784	0,004
820957452	Chain B, Dihydroorotate dehydrogenase	x	x	x	1,224	0,009
1474891757	Chain B, Glucokinase	x	x	x	0,732	0,011
1527124539	DNA_primase_large_subunit	NA	x	x	1,237	0,017
1527124653	Cytokine-induced_anti-apoptosis_inhibitor_1	x	x	x	1,059	0,040
1527124698	hypothetical_protein	x	x	x	0,596	0,042

1527124751	peptide_methionine_sulfoxide_reductase-like	x	x	x	1,060	0,002
1527124805	hypothetical_protein	NA	x	x	0,735	0,005
1527125001	hypothetical_protein	NA	x	x	0,945	0,000
1527125084	pteridine_transporter_(truncated)	NA	x	NA	1,527	0,018
1527125176	Archaic_translocase_of_outer_membrane_12_kDa_subunit	x	x	x	0,787	0,003
1527125192	hypothetical_protein	x	x	x	0,792	0,004
1527125229	GRIP_domain_containing_protein	x	x	x	0,834	0,043
1527125304	hypothetical_protein	x	x	x	0,995	0,013
1527125394	ornithine_decarboxylase	x		NA	1,853	0,017
1527125431	Leucine_Rich_repeat	x	x	x	0,692	0,010
1527125479	Lipase_(class_3)	x	x	x	1,287	0,020
1527125727	hypothetical_protein	x	x	x	0,846	0,016
1527125731	small_myristoylated_protein-3	NA	x	x	0,842	0,002
1527125861	ecotin	x		x	1,917	0,040
1527125870	CRAL/TRIO_domain_containing_protein	x	x	x	0,588	0,004
1527125886	hypothetical_protein	x	x	x	0,873	0,011
1527125916	tryparedoxin_peroxidase	x	x	x	0,994	0,022
1527125922	60S_acidic_ribosomal_protein_P2	x	x	x	0,816	0,031
1527126100	hypothetical_protein	x	x	x	0,650	0,032
1527126251	Acytransferase	x	x	x	0,811	0,030
1527126338	hypothetical_protein	NA	x	x	2,395	0,026
1527126343	protein_kinase	NA	x	NA	0,803	0,026
1527126358	prefoldin_5-like_protein	x	x	x	0,665	0,001
1527126369	hypothetical_protein	x	x	x	1,226	0,005
1527126397	hypothetical_protein	x	x	NA	0,857	0,037
1527126570	hypothetical_protein	x	x	x	1,251	0,007
1527126595	Protein_of_uncharacterised_function_(DUF3250)	NA	NA	x	0,924	0,041
1527126654	WW_domain/Zinc_finger_C-x8-C-x5-C-x3-H_type_(and_similar)	NA	x	x	0,728	0,010
1527126662	Vacuolar_iron_transporter_1	x	x	x	1,068	0,022
1527126665	hypothetical_protein	x	x	x	0,979	0,049
1527126781	hypothetical_protein	x		NA	0,607	0,025
1527127103	Zinc_transporter_3	NA	x	x	1,519	0,018
1527127153	hypothetical_protein	NA	x	x	0,606	0,027
1527127432	hypothetical_protein	NA	x	x	2,526	0,029
1527127463	hypothetical_protein	NA	x	x	1,950	0,001
1691131665	DNA_excision/repair_protein_SNF2	NA	x	x	1,489	0,028
1691131694	long-chain-fatty-acid-CoA_ligase	x	x	x	0,891	0,007
1691131706	HSP70-like_protein	NA	x	x	1,101	0,038
1691131779	FtsJ-like_methyltransferase	NA	x	x	1,287	0,035
1691131866	hypothetical_protein	x	x	x	1,264	0,009
1691132001	dynein_light_chain	x	x	x	0,633	0,022
1691132039	hypothetical_protein	NA	x	x	1,668	0,027
1691132144	WD_domain	x		x	0,813	0,031
1691132208	hypothetical_protein	x	x	x	0,863	0,014
1691132251	protein_disulfide_isomerase	x	x	x	0,800	0,044
1691132252	deoxyribose-phosphate_aldolase	x	x	x	0,969	0,000
1691132264	Thioredoxin	NA	x	NA	0,759	0,045
1691132273	hypothetical_protein	x		x	0,770	0,010

1691132323	60S_ribosomal_protein_L7	x	x	x	0,683	0,018
1691132352	Zn-finger_in_Ran_binding_protein_and_others/FYVE_zinc_finger_containing_protein	x	x	x	0,750	0,003
1691132517	Multiprotein-bridging_factor_1	x	x	x	0,650	0,017
1691132520	polyprenyl_synthase	x	x	x	0,651	0,005
1691132748	hypothetical_protein	NA	x	x	0,763	0,019
1691132771	WD_domain	NA	x	x	2,189	0,033
1691132858	hypothetical_protein	x		NA	0,670	0,006
1691133265	hypothetical_protein	x	x	x	0,813	0,000
1691133290	hypothetical_protein	NA	x	x	1,567	0,037
1691133322	RNasePH-like_protein	x	x	x	0,765	0,000
1691133334	hypothetical_protein	NA	x	x	0,746	0,030
1691133462	metallo-beta-lactamase_family-like_protein	x		x	0,919	0,014
1691133490	hypothetical_protein	NA	x	x	0,628	0,026
1691133584	hypothetical_protein	x	x	x	0,921	0,021
1691133664	ankyrin/TPR_repeat_protein	x	x	x	0,958	0,001
1691133709	Ribosome_60S_biogenesis_N-terminal	x	x	x	0,611	0,039
1691134147	Tetratricopeptide_repeat/TPR_repeat	x		NA	0,678	0,017
1691134267	hypothetical_protein	NA	x	x	1,157	0,032
1691134366	RNA_recognition_motif_(a.k.a._RRM	x	x	x	0,642	0,038
1691134436	kynureninase	x	x	x	0,952	0,048
1691134537	Protein_phosphatase_inhibitor_2_(IPP-2)	x	x	x	0,768	0,000
1691134582	hypothetical_protein	x	x	NA	1,129	0,019
1691134682	Nodulin-like/Major_Facilitator_Superfamily	x		NA	0,873	0,026
1691134700	histone_H2A	x	x	x	1,544	0,015
1691134711	hypothetical_protein	x	x	x	1,410	0,030
1691134956	Prefoldin_subunit	x	x	x	0,589	0,000
1691135074	hypothetical_protein	x	x	x	0,711	0,000
1691135186	Translocon-associated_protein_beta_(TRAPB)/Domain_of_unccharacterised_function_DUF11/CARDB	x	x	x	0,633	0,031
1691135309	ATP-dependent_RNA_helicase	x	x	x	0,599	0,000
1691135365	amino_acid_permease_3	x	x	NA	0,670	0,038
1691135512	hypothetical_protein	x	x	x	1,020	0,032
1691136016	hypothetical_protein	x	x	x	1,004	0,015
1691136146	thiol-dependent_reductase_1	x	x	x	0,709	0,002
1691136184	Ras-induced_vulval_development_antagonist	NA	x	x	1,682	0,038
1691136364	kinesin	NA	x	x	1,206	0,006
1691136425	3-oxoacyl-acyl_carrier_protein_synthase_ii	x		NA	1,845	0,013
1691136472	hypothetical_protein	x	x	x	0,591	0,000
1691136579	PUB_domain_containing_protein	x	x	NA	0,974	0,019
1691136598	20S_proteasome_subunit	x	x	x	1,258	0,005
1691136639	zinc_finger_protein_family_member	NA	x	NA	1,256	0,031
1691136769	inosine-guanosine_transporter	x	x	x	0,770	0,003
1691136782	chaperonin_HSP60	x	x	x	0,960	0,008
1691136857	hypothetical_protein	NA	x	x	0,716	0,036
1691136873	predicted_zinc_finger_protein	NA	x	x	1,352	0,013
1691137001	Regulator_of_chromosome_condensation_(RCC1)_repeat	x	x	x	0,589	0,013
1691137175	tRNA_pseudouridine_synthase_TruD	x	x	x	0,881	0,009

1691137189	Haloacid_dehalogenase-like_hydrolase	x	x	x	0,618	0,000
1691137191	hypothetical_protein	x	x	x	0,720	0,008
1691137207	disgorgin	x	x	NA	1,400	0,014

Tabela suplementar S3:

Protein ID	Description	Rep.1	Rep2	Rep.3	Ratio A vs T	pval
2660760	surface protein amastin	NA	x	x	-0,770	0,010
2736236	kinetoplastid membrane protein-11	NA	x	x	-2,364	0,043
9864199	heat shock protein 70	x	x	x	-2,717	0,006
13991862	p36 LACK protein	x	x	x	-1,900	0,005
134059037	putative adenosine monophosphate deaminase	x	x	x	-0,771	0,000
134059269	cyclophilin 2	x	x	x	-0,937	0,009
134059318	putative carbonic anhydrase family protein	x	x	x	-0,706	0,000
134059324	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-0,755	0,001
134059594	phosphoribosylpyrophosphate synthetase	x	x	NA	-0,859	0,006
134059630	RNA-binding protein 5-like protein	NA	x	x	-1,612	0,042
134059857	putative amino acid transporter	x	x	x	-0,614	0,015
134059911	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-0,957	0,027
134059926	GP63, leishmanolysin	x	x	NA	-1,869	0,016
134060363	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-0,694	0,000
134060397	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	-0,900	0,008
134060398	RNA editing 3' terminal uridylyl transferase 1	x	x	NA	-0,797	0,005
134060531	conserved hypothetical protein	NA	x	x	-1,288	0,007
134060652	protein tyrosine phosphatase-like protein	x	x	NA	-1,679	0,018
134060678	conserved hypothetical protein	NA	x	x	-1,208	0,014
134060842	conserved hypothetical protein	NA	x	x	-0,988	0,003
134060952	conserved hypothetical protein	NA	NA	x	-1,387	0,043
134061071	protein kinase A catalytic subunit	x	x	x	-0,676	0,013
134061088	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,629	0,046
134061211	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,798	0,000
134061232	glycosomal malate dehydrogenase	x	x	x	-0,944	0,002
134061277	putative RNA binding protein	x		NA	-1,601	0,001
134061380	putative proteasome regulatory non-ATP-ase subunit 11	x	x	x	-0,675	0,000
134061521	protein phosphatase 2C-like protein	NA	x	x	-0,979	0,002
134061715	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-0,858	0,021
134061779	putative hexokinase	x	x	x	-1,127	0,001
134061954	beta tubulin	x	x	x	-1,938	0,000
134062070	putative translation initiation factor IF-2	NA	x	NA	-0,623	0,027
134062289	conserved hypothetical protein	NA	x	x	-0,741	0,000
134062316	fatty acid desaturase	x	x	x	-0,700	0,003
134062465	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	-1,073	0,001
134062500	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,820	0,003
134062579	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,612	0,001
134062648	dehydrogenase-like protein	x		x	-0,888	0,005
134062667	putative cytochrome c oxidase VII	x	x	x	-0,618	0,003
134062683	conserved hypothetical protein	x	x	x	-1,213	0,000
134062758	GTP-binding protein, putative	x	x	x	-0,901	0,000
134062772	hypothetical protein, conserved	x	x	NA	-0,833	0,019
134062836	conserved hypothetical protein	NA	x	x	-0,789	0,040
134062873	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	-0,951	0,016
134063388	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	-2,124	0,035
134063585	conserved hypothetical protein	NA	x	x	-0,668	0,005
134063632	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,662	0,018
134064082	conserved hypothetical protein	NA	x	x	-0,685	0,034
134064168	putative endosomal trafficking protein RME-8	x	x	NA	-0,880	0,002

134064203	conserved hypothetical protein	NA	x	x	-0,728	0,023
134064515	conserved hypothetical protein	x	x	x	-1,033	0,004
134064670	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-0,943	0,024
134064736	putative 26S proteasome regulatory subunit	x	x	x	-0,623	0,000
134064760	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,773	0,003
134064851	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-1,003	0,001
134065175	putative protein phosphatase 2A regulatory subunit	NA	x	NA	-0,587	0,027
134065204	beta-tubulin	x	x	x	-1,318	0,000
134065243	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,659	0,002
134065390	subunit	x	x	x	-0,682	0,000
134065491	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein, conserved	x	x	x	-0,623	0,046
134065545	aldose 1-epimerase-like protein	NA	x	x	-1,330	0,033
134065590	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-0,628	0,010
134065654	conserved hypothetical protein	x		x	-0,978	0,048
134065827	EF hand containing protein	x	x	x	-0,733	0,007
134065838	protein kinase A catalytic subunit isoform 1	x	x	x	-0,765	0,021
134065866	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,612	0,001
134066059	ADP-ribosylation factor-like protein	x	x	NA	-0,759	0,001
134066129	putative nima-related protein kinase	x	x	x	-0,799	0,000
134066142	conserved hypothetical protein	x	x	x	-1,171	0,000
134066315	putative actin-like protein	x	x	x	-1,322	0,005
134066661	putative replication factor C, subunit 5	NA	x	NA	-0,797	0,033
154331840	putative ADP-ribosylation factor	x	x	x	-1,237	0,000
154331958	putative cytochrome c oxidase assembly factor	x		NA	-0,686	0,030
154332161	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,690	0,000
154332714	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,614	0,001
154332786	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-0,748	0,046
154332824	hypothetical protein, unknown function	x		x	-0,608	0,003
154332880	kinetoplast-associated protein-like protein	x	x	NA	-1,062	0,042
154333462	putative 40S ribosomal protein S21	x	x	x	-1,282	0,005
154333721	cytochrome c oxidase subunit IV	x	x	x	-0,629	0,000
154333930	katanin-like protein	x		x	-1,049	0,031
154333990	hypothetical protein, unknown function	NA	NA	x	-0,772	0,002
154334175	cystathionine beta-lyase-like protein	x	x	NA	-0,849	0,041
154334508	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,846	0,006
154334646	mitochondrial DNA topoisomerase II	x	x	x	-0,609	0,043
154334723	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,823	0,000
154334929	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,635	0,016
154335029	putative endoplasmic reticulum oxidoreductin	x	x	x	-0,938	0,000
154335697	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,711	0,014
154335884	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-0,930	0,003
154336016	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,785	0,008
154336115	putative adenylate kinase	x	x	x	-0,598	0,002
154336249	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	-0,679	0,000
154336277	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,978	0,000
154336411	putative protein kinase	NA	x	x	-1,029	0,000
154336475	putative dolichyl-P-Man:GDP-Man1GlcNAc2-PP-dolichyl alpha-1,3-mannosyltransferase	x	x	x	-1,221	0,005
154337286	choline dehydrogenase, like protein	x		x	-1,062	0,040
154338109	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-0,618	0,009

154338327	putative translation factor sui1	x	x	x	-0,694	0,018
154338716	putative protein kinase	NA	x	x	-0,703	0,000
154338764	DNAj-like protein	x	x	x	-0,601	0,039
154338784	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	x	x	x	-0,696	0,004
154338794	putative ATPase beta subunit	x	x	x	-0,615	0,000
154339151	putative C-1-tetrahydrofolate synthase,cytoplasmic	x	x	x	-0,655	0,022
154339443	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-0,711	0,003
154339650	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-2,048	0,033
154339886	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,646	0,001
154339936	conserved hypothetical protein	x	x	NA	-0,778	0,004
154340173	conserved hypothetical protein	x		NA	-1,250	0,012
154340281	ER lumen retaining receptor-like protein	NA	NA	x	-1,046	0,034
154340405	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,698	0,005
154340649	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,600	0,004
154340751	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	-0,737	0,039
154341637	conserved hypothetical protein	x		x	-0,856	0,014
154341859	formate--tetrahydrofolate ligase	x	x	x	-0,819	0,001
154342170	conserved hypothetical protein	NA	x	x	-0,613	0,046
154343223	putative rab11B GTPase	x	x	x	-0,822	0,000
154343734	conserved hypothetical protein	x		NA	-1,017	0,013
154344046	conserved hypothetical protein	NA	x	x	-0,725	0,045
154344375	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,721	0,001
154344383	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,600	0,006
154344429	conserved hypothetical protein	x		NA	-0,797	0,011
154344567	putative short chain dehydrogenase	x	x	x	-1,017	0,000
154344621	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,749	0,004
154344893	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,598	0,007
154344961	putative replication factor C, subunit 3	NA	x	x	-0,775	0,014
154345456	putative dolicholphosphate-mannose synthase	NA	x	NA	-0,586	0,027
154345624	putative short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	x	x	x	-0,825	0,005
154345650	conserved hypothetical protein, partial	x	x	x	-0,935	0,000
154345708	conserved hypothetical protein	x		NA	-0,679	0,027
154345788	putative T-lymphocyte triggering factor	x	x	x	-0,608	0,001
154345950	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,807	0,000
154346004	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,634	0,004
322504655	mitochondrial malate dehydrogenase	x	x	x	-1,150	0,001
322504784	conserved hypothetical protein	NA	x	x	-0,781	0,044
322505720	putative cytochrome P450 reductase	x		NA	-1,617	0,012
322505841	putative adaptin	NA	x	NA	-0,670	0,003
389599899	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,593	0,001
389600023	exportin T (tRNA exportin)-like protein	NA	x	NA	-1,343	0,020
389600682	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	-1,821	0,002
389602236	conserved hypothetical protein	NA	x	x	-0,781	0,019
389602502	methylcrotonoyl-coa carboxylase biotinylated subunitprotein-like protein	x	x	x	-0,683	0,002
389602980	putative ADP-ribosylation factor-like 2, arl2	x	x	x	-2,349	0,001
389603029	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,759	0,002
389603467	putative target of rapamycin (TOR) kinase 1	x	x	x	-1,744	0,010
389603632	serine palmitoyltransferase-like protein	x	x	x	-1,821	0,004
389603652	conserved hypothetical protein	NA	x	NA	-0,690	0,018

389603980	conserved hypothetical protein	x	x	x	-0,892	0,004
389603992	putative N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	x	x	x	-0,801	0,026
1527124545	hypothetical_protein	NA	x	NA	-0,903	0,028
1527124625	hypothetical_protein	NA	x	x	-0,718	0,004
1527124642	Sec7_domain_containing_protein	NA	x	x	-0,665	0,004
1527124689	hypothetical_protein	x	x	x	-0,601	0,005
1527124697	vacuolar-type_Ca2+-ATPase	x		x	-0,665	0,014
1527124729	Domain_of_uncharacterised_function_(DUF3437)	x	x	NA	-0,759	0,029
1527124771	inositol_phosphosphingolipid_phospholipase_C-Like	x	x	x	-0,900	0,000
1527124980	calmodulin	x	x	x	-0,718	0,009
1527125196	hypothetical_protein	x	x	x	-0,687	0,001
1527125311	ATPase	NA	x	x	-0,787	0,002
1527125414	vacuolar_ATP_synthase_subunit	x	x	x	-1,029	0,000
1527125427	protein_phosphatase_with_EF-Hand_domains_(PPEF)	x	x	x	-0,712	0,002
1527125473	Kinesin-13_2	NA	x	x	-1,468	0,018
1527125492	alpha_tubulin	x	x	x	-0,675	0,002
1527125502	alpha_tubulin	x	x	x	-1,077	0,001
1527125586	DNA-directed_RNA_polymerase_I_subunit	NA	x	NA	-0,817	0,002
1527125755	dynein_heavy_chain	x	x	NA	-0,696	0,019
1527125783	serine_hydroxymethyltransferase_(SHMT-L)	x	x	x	-0,811	0,016
1527125831	lysyl-tRNA_synthetase	x	x	x	-0,642	0,012
1527125840	Isoprenylcysteine_alpha-carbonyl_methylesterase	NA	x	x	-1,434	0,013
1527125974	Phosphotransferase_enzyme_family	x	x	x	-0,750	0,002
1527125990	proteasome_26S_non-ATPase_subunit_9	x	x	x	-0,722	0,002
1527126088	cytochrome_c	x	x	x	-0,842	0,041
1527126095	hypothetical_protein	x	x	x	-1,474	0,006
1527126109	kinesin	x	x	x	-1,144	0,026
1527126296	IQ_calmodulin-binding_motif_containing_protein	x		NA	-1,826	0,025
1527126463	peroxidoxin	x	x	x	-0,755	0,025
1527126498	ATP-binding_cassette_protein_subfamily_G	x	x	x	-0,638	0,011
1527126688	glycosomal_transporter_(GAT3)	x	x	x	-0,950	0,001
1527126783	CBF/Mak21_family	x	x	x	-0,610	0,006
1527126885	3-oxoacyl-ACP_reductase	NA	NA	x	-0,757	0,029
1527126957	DNA_repair_protein_RAD51	NA	x	NA	-0,999	0,000
1527127046	haloacid_dehalogenase-like_hydrolase-like_protein	x	x	x	-0,640	0,040
1527127130	Methyltransferase_domain_containing_protein	NA	NA	x	-1,096	0,019
1527127236	2-oxoisovalerate_dehydrogenase_beta_subunit	x	x	x	-0,651	0,007
1527127372	rieske_iron-sulfur_protein	x	x	x	-0,684	0,000
1527127391	ubiquitin_hydrolase	NA	x	NA	-0,950	0,035
1527127413	UBX_domain_containing_protein	x	x	x	-0,882	0,000
1527127462	Autophagy-related_protein_24	x	x	x	-0,945	0,000
1527127490	acyl-CoA_dehydrogenase	x	x	x	-0,862	0,005
1691131882	beta-fructofuranosidase	x	x	x	-0,781	0,045
1691131890	Phytanoyl-CoA_dioxygenase_(PhyH)	NA	x	NA	-0,735	0,021
1691131940	hypothetical_protein	x	x	x	-0,794	0,001
1691132038	dynein-light_chain-protein	NA	x	NA	-1,301	0,018
1691132075	Mitochondrial_glycoprotein	x	x	x	-0,935	0,022
1691132168	ribonuclease_H1	x		NA	-0,909	0,006
1691132275	coproporphyrinogen_III_oxidase	x	x	x	-0,730	0,008
1691132629	SPFH_domain/_Band_7_family	x	x	x	-0,882	0,001

1691132736	malate_dehydrogenase	x		NA	-0,709	0,005
1691132819	DNA-directed_RNA_polymerase_III_subunit	x	x	x	-0,592	0,000
1691133303	cysteine_peptidase	x	x	x	-0,852	0,000
1691133500	aspartyl-tRNA_synthetase	x		x	-1,083	0,012
1691133589	mitochondrial_structure_specific_endonuclease_I_(SSE-1)	x	x	x	-0,678	0,000
1691133659	hypothetical_protein	NA	x	NA	-1,376	0,003
1691133740	DNA_replication_licensing_factor_MCM5	NA	x	x	-0,727	0,002
1691133838	lysophospholipase	x	x	x	-0,595	0,001
1691133878	hypothetical_protein	x	x	NA	-0,653	0,027
1691134243	hypothetical_protein	x	x	x	-1,449	0,002
1691134687	glutamamyl_carboxypeptidase	x	x	x	-1,063	0,036
1691134981	DREV_methyltransferase	x	x	x	-0,866	0,001
1691135077	hypothetical_protein	x		x	-0,696	0,025
1691135204	hypothetical_protein	x	x	x	-0,689	0,035
1691135210	PAS-domain_containing_phosphoglycerate_kinase	x	x	x	-0,789	0,001
1691135386	amidohydrolase	x	x	x	-0,912	0,006
1691135452	nucleosome_assembly_protein-like_protein	x	x	x	-0,622	0,001
1691135524	hypothetical_protein	x		NA	-0,778	0,002
1691135762	small_nuclear_ribonucleoprotein	x	x	x	-0,607	0,002
1691135777	Pentatricopeptide_repeat_domain/PPR_repeat/PPR_repeat family	x	x	NA	-0,683	0,010
1691135836	protein_kinase	x	x	x	-0,743	0,029
1691135851	like_protein	x	x	x	-0,641	0,038
1691135860	Ras-related_protein_RAB2B	x	x	x	-0,589	0,030
1691135953	ubiquitin_hydrolase	NA	x	x	-0,663	0,013
1691136217	beta_tubulin	x	x	x	-0,730	0,000
1691136233	hypothetical_protein	x	x	x	-0,750	0,033
1691136263	hypothetical_protein	NA	x	NA	-1,124	0,032
1691136287	amino_acid_permease-like_protein	x	x	x	-0,632	0,042
1691136297	PRA1_family_protein	x	x	x	-1,108	0,004
1691136346	RNA_editing_complex_protein_MP46	x	x	NA	-0,753	0,001
1691136365	WD_domain	x	x	x	-0,763	0,000
1691136679	Memo-like_protein	x	x	x	-0,620	0,035
1691136916	Macro_domain_containing_protein	x	x	x	-0,639	0,027
1691137138	phosphoribosylpyrophosphate_synthetase	x	x	x	-0,729	0,005
1691137228	small_G-protein	NA	x	x	-1,445	0,026
1691137230	chaperone_protein_DNAj	x	x	x	-0,610	0,009
1691137270	Sperm_tail/Sperm_tail_C-terminal_domain_containing_protein	x	x	x	-1,407	0,014