

Bruna Soares de Souza Lima Rodrigues

**Caracterização imunoproteômica dos antígenos de *Leishmania*  
(*Leishmania*) *infantum*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis*  
detectados pela técnica de imuno-histoquímica**

Belo Horizonte  
2013

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

**Caracterização imunoproteômica dos antígenos de *Leishmania*  
(*Leishmania*) *infantum*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis*  
detectados pela técnica de imuno-histoquímica**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia.

**Orientador:** Dr. Wagner Luiz Tafuri

**Co-orientadora:** Dra. Héli da Monteiro de Andrade

Bruna Soares de Souza Lima Rodrigues

Belo Horizonte  
2013

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Bruno e Rejane, e ao meu grande amor, Léo!

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

Theodore Roosevelt

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu chegar até aqui!

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

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

Às minhas irmãs Marcela e Daniela, que sempre estiveram do meu lado, nos momentos tristes e alegres.

À Paulinha, minha irmã e amiga, que mesmo sem entender sobre o meu projeto, sempre foi paciente para ouvir minhas explicações, meus choros, meus lamentos, mas principalmente, meus “gritos” de alegria.

Ao meu sobrinho, Pedro, por me proporcionar muitos momentos de felicidade!

À querida professora Héliida, pelos ensinamentos e orientação impecável, mas principalmente, pela pessoa maravilhosa que ela é. Amiga, companheira, humana, enfim, uma pessoa incrível, que eu pude conviver de forma bastante harmoniosa.

Ao professor Wagner pela orientação e disponibilidade.

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

À Ana Luíza, sempre companheira, alegre e, acima de tudo, uma amiga verdadeira. Nunca vou esquecer as inúmeras madrugadas que passamos estudando na sua casa. Foi muito especial!

À Júlia que se tornou extremamente importante na minha vida. Foram muitos momentos de desabafo, desespero, mas principalmente de muitas alegrias. Você é o meu potinho de ouro no final do arco-íris!

À Luciana Lima, pelo apoio incondicional e amizade em todos os momentos, desde os tempos do comportamento, no laboratório de Triatomíneos.

Ao Júnior, que me ensinou toda a parte prática sobre proteômica.

À Simone, pela paciência no EM e às várias contribuições para tornar o meu trabalho melhor.

Ao João Carlos por me ajudar durante o processo de crescimento dos parasitos.

A todos do laboratório de Leishmanioses: Elaine, Jordanna, Angélica, Aliane, Ana Paula, Mariana, Janaína, Nayara, André e Luciano, pela convivência intensa e feliz.

A todos do laboratório de Patologia de Leishmanioses: Ricardo, Vânia, Belinha, Carol, Igor, Daniel, Vitor, Marta, César, Aldair e Rodrigo.

À Leticia Marques pelo apoio e incentivo para buscar esse sonho!

À Rafaela Paim pelos conselhos, conversas intermináveis e o carinho sempre!

Ao programa de Pós-graduação.

Aos professores de Parasitologia pelos ensinamentos e disponibilidade para nos atender.

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

Aos colegas do Departamento.

## Sumário

Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas e siglas .....	xii
Resumo .....	xiv
Abstract .....	xv
1 Introdução.....	01
1.1 Leishmanioses e <i>Leishmania</i> .....	01
1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana.....	03
1.3 Leishmaniose Visceral.....	05
1.4 Diagnóstico.....	07
1.5 Controle.....	11
1.6 Proteômica.....	12
2 Justificativa.....	14
3 Objetivos.....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 Materiais e métodos.....	18
4.1 Parasitos e cultura.....	18
4.2 Extração de Proteínas.....	18
4.3 Eletroforese Bidimensional(2-DE).....	18
4.4 Western blot - 2D gel.....	19
4.5 Análise de Reprodutibilidade dos géis e membranas.....	20

4.6 Seleção das proteínas antigênicas.....	20
4.7 Identificação das proteínas.....	21
5 Resultados.....	22
5.1 Dosagem das proteínas.....	22
5.2 Determinação dos perfis protéicos de <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> .....	22
5.3 Western blot.....	25
5.4 Seleção e Identificação das proteínas antigênicas.....	28
6 Discussão.....	38
7 Conclusão.....	46
8 Referências bibliográficas.....	47
9 Anexo.....	58

## Lista de figuras

- Figura 1:** Géis 2DE de 7 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, corados por Coomassie Brilliant blue G250. A1, A2 e A3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L.amazonensis*. Abaixo, gráficos demonstrando os índices de correlação entre os géis.....23
- Figura 2:** Géis 2DE de 7 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, corados por Coomassie Brilliant blue G250. B1, B2 e B3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L.braziliensis*. Abaixo, gráficos demonstrando os índices de correlação entre os géis.....24
- Figura 3:** Géis 2DE de 7 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, corados por Coomassie Brilliant blue G250. C1, C2 e C3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L.infantum*. Abaixo, gráficos demonstrando os índices de correlação entre os géis.....24
- Figura 4:** Membranas de nitrocelulose mostrando as proteínas de *L. amazonensis* reativas ao teste de Tafuri *et al.*, 2004, em A1 e o controle negativo para a mesma espécie em A2.....26
- Figura 5:** Membranas de nitrocelulose mostrando as proteínas de *L. braziliensis* reativas ao teste de Tafuri *et al.*, 2004, em B1 e o controle negativo para a mesma espécie em B2.....27
- Figura 6:** Membranas de nitrocelulose mostrando as proteínas de *L. infantum* reativas ao teste de Tafuri *et al.*, 2004, em C1 e o controle negativo para a mesma espécie em C 2.....27
- Figura 7:** Géis 2DE de 18 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, corados por Coomassie Brilliant blue G250. A1, A2 e A3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L.amazonensis*. Abaixo, gráficos demonstrando os índices de correlação entre os géis.....29
- Figura 8:** Géis 2DE de 18 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, corados por Coomassie Brilliant blue G250. B1, B2 e B3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L.braziliensis*. Abaixo, gráficos demonstrando os índices de correlação entre os géis.....29
- Figura 9:** Géis 2DE de 18 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, corados por Coomassie Brilliant blue G250. C1, C2 e C3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L. infantum*. Abaixo, gráficos demonstrando os índices de correlação entre os géis.....30
- Figura 10:** Membranas de nitrocelulose de 18cm mostrando as proteínas reativas ao teste de Tafuri *el al.*, 2004, para *L. amazonensis* (A), *L. braziliensis* (B) e *L.infantum* (C), respectivamente.....31

**Figura 11:** Representação de um gel e uma membrana de 18cm de *L. amazonensis* e os *spots* selecionados para identificação. Os números dos *spots* são correspondentes no gel, membrana e tabela de A1 a A34..... 32

**Figura 12:** Representação de um gel e uma membrana de 18cm de *L. braziliensis* e os *spots* selecionados para identificação. Os números dos *spots* são correspondentes no gel, membrana e tabela de B1 a B25.....33

**Figura 13:** Representação de um gel e uma membrana de 18cm de *L. infantum* e os *spots* selecionados para identificação. Os números dos *spots* são correspondentes no gel, membrana e tabela de C2 a C29.....33

**Figura 14:** Diagrama de Venn representando as proteínas identificadas que são específicas para cada uma das espécies e aquelas que são compartilhadas entre duas, ou todas as espécies.....37

## Lista de tabelas

- Tabela 1:** Valores da dosagem de proteínas das amostras de *Leishmania amazonensis* (PH8), *L.braziliensis* (2904) e *L. infantum* (BH46) usando o 2D-Quant kit(GE Healthcare).....22
- Tabela 2:** Número de *spots* obtidos para *Leishmania amazonensis* (PH8), *L.braziliensis* (2904) e *L. infantum* (BH46), número médio de *spots* e percentual de correlação entre os géis comparados para cada espécie.....25
- Tabela 3:** Número de *spots* reativos para *Leishmania amazonensis* (PH8), *L.braziliensis* (2904) e *L. infantum* (BH46), número médio de *spots* reativos e percentual de correlação entre as membranas comparadas para cada espécie.....28
- Tabela 4:** Número de *spots* obtidos para *Leishmania amazonensis* (PH8), *L.braziliensis* (2904) e *L. infantum* (BH46), número médio de *spots* e percentual de correlação entre os géis comparados para cada espécie.....31
- Tabela 5:** Representação dos *spots* selecionados, das correspondentes proteínas identificadas e seus respectivos Gi em *L. amazonensis*.....34
- Tabela 6:** Representação dos *spots* selecionados, das correspondentes proteínas identificadas e seus respectivos Gi em *L. braziliensis*.....34
- Tabela 7:** Representação dos *spots* selecionados, das correspondentes proteínas identificadas e seus respectivos Gi em *L. infantum*.....35
- Tabela 8:** Representação do número de *spots* selecionados, identificados e as proteínas correspondentes, para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L.infantum*.....35
- Tabela 9:** Demonstração das proteínas identificadas exclusivamente em cada uma das espécies estudadas, bem como seus respectivos Gi.....36

## Lista de abreviaturas e siglas

BSA: Albumina bovina

DAB: Diaminobenzidina

DAT: Teste de Aglutinação Direta

DPP® - *Dual Path Platform*

DTT: Ditioneitol

ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*

EM: Espectrometria de Massa

HE: Hematoxilina/ Eosina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peroxido de hidrogênio

IAA: Iodoacetamida

IFN- $\gamma$ : Interferon gama

IHQ: Imuno-histoquímica

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL: Interleucina

KDa: KiloDalton

LC: Leishmaniose Cutânea

LIT: Liver Infusion Triptose

LV: Leishmaniose Visceral

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LMC: Leishmaniose Mucocutânea

MM: Massa Molecular

NNN: Meio de cultura Novy, McNeal e Nicolle

PBS: Tampão Salina Fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PKDL: Leishmaniose Dérmica Pós Calazar

pI: ponto isoelétrico

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta

RPM: Rotação por minuto

RPMI: Meio Roswell Park Memorial Institute

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SFB: Soro fetal bovino

SMM: Sistema Mononuclear Monocítico Fagocitário

SUS: Sistema Único de Saúde

WB: *western blot*

WHO: *World Health Organization*

## Resumo

Leishmanioses são parasitoses causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e encontram-se entre as principais endemias no mundo. A leishmaniose pode ser subdividida, dependendo da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro, em cinco formas clínicas principais: cutânea localizada, cutânea difusa, cutânea disseminada, mucocutânea e visceral; essa última a forma mais grave, podendo ser fatal, se não tratada. Diferentes métodos de diagnóstico são usados para a confirmação da doença, dentre os quais podemos citar: parasitológico, molecular e imunológico. Apesar do diagnóstico de certeza ser o parasitológico, o diagnóstico definitivo, na maioria das vezes, resulta da associação desses diferentes métodos. Um dos métodos parasitológicos utilizados em laboratório de patologia para identificação de formas amastigotas de *Leishmania* em amostras tecidos de pacientes (biópsias) é a técnica de imuno-histoquímica. Tafuri *et al.*, 2004 demonstraram um método imuno-histoquímico de diagnóstico para leishmaniose visceral canina que, segundo, os autores, trata-se de uma técnica tão eficiente quanto as rotineiras, porém menos dispendiosa. Esse trabalho justifica-se pela busca de uma melhor compreensão dessa metodologia por meio da identificação das proteínas reativas, que permitem que a mesma seja usada para ambas as formas clínicas: LV e LTA. Para isso foram utilizados extratos protéicos de espécies de *Leishmania* fracionados em gel 2-DE seguido de *western blot*, utilizando o soro da técnica preconizada por Tafuri *et al.*, 2004. Foram selecionados para identificação por EM os *spots* reativos em cada espécie e por todas as espécies simultaneamente. Dentre as proteínas identificadas, duas foram comuns às três espécies, hsp 70 e  $\beta$ -tubulina, e seis foram específicas para *L. amazonensis*, nove para *L. braziliensis* e quatro para *L. infantum*. Algumas dessas proteínas já foram descritas na literatura em relação a sua antigenicidade, enquanto outras parecem ser antígenos novos, que poderiam ser alvos de estudos futuros, para o desenvolvimento de teste diagnóstico alternativo.

Palavras-chave: proteômica, *Leishmania*, imunohistoquímica

## Abstract

Leishmaniasis are caused by flagellate parasites of the genus *Leishmania* and are among the main endemic diseases of the world. The leishmaniasis can be subdivided, depending on parasite species and host immune response into five main clinical forms: localized cutaneous, diffuse cutaneous, disseminated cutaneous, mucocutaneous and visceral, which is the most severe form of leishmaniasis, may be fatal if left untreated. Different diagnostic methods are used for confirmation of the disease, among which we can mention: parasitological, molecular and immunological. Although the parasitological diagnosis be sure, the definitive diagnosis, in most cases, results from the combination of these different methods. One of the parasitological methods used in pathology laboratory for identification of *Leishmania* amastigotes in tissue samples of patients (biopsies) is the immunohistochemistry technique. Tafuri *et al.*, 2004 demonstrated a immunohistochemistry diagnosis for canine visceral leishmaniasis, that according to the authors this is an technique as efficient as routine, but less expensive. Therefore, this work is justified for a better understanding of this methodology by identifying reactive proteins that makes this test able to be used in both clinical forms: ATL and VL. To this, protein extracts of *Leishmania* species were fractionated in to 2-DE gels followed by western blot using serum on technique recommended by Tafuri *et al.*,2004. The reactive spots in each species and all species simultaneously, were selected to identification by MS. Among the proteins identified, two were common to the three species, hsp 70 and  $\beta$ -tubulin, and six were specific to *L. amazonensis*, nine to *L. braziliensis* and four to *L. infantum*. Some of these proteins have been described in the literature because of its antigenicity, whereas others appear to be new antigens, which could be targets of future studies for developing alternative diagnostic test.

Key words: proteomic, *Leishmania*, immunohistochemistry

# 1 Introdução

## 1.1 Leishmanioses e *Leishmania*

Atualmente, as leishmanioses encontram-se entre as principais endemias no mundo (WHO, 2013). Nas Américas tem caráter zoonótico podendo acometer o homem de forma acidental, quando este se insere no ciclo de transmissão do parasito. No Brasil, as leishmanioses apresentam importância nos contextos sanitário, econômico e social, devido a sua ampla distribuição geográfica e gravidade de suas manifestações clínicas. Nos últimos anos, têm se tornado ainda mais relevante, em virtude do aumento da incidência e disseminação de algumas formas da doença para novas áreas geográficas, além da tendência à urbanização. As modificações ambientais causadas pelo homem têm alterado o perfil epidemiológico da doença em diversas áreas, exigindo a adaptação do vetor para o estabelecimento do ciclo das leishmanioses (Tolezano *et al.*, 1980; Lainson, 1989; Marzochi, 1992). As dificuldades referentes ao diagnóstico, tratamento e controle das diversas formas das leishmanioses também são fatores que devem ser considerados, pois interferem diretamente na epidemiologia da doença (Marzochi & Marzochi, 1994).

As leishmanioses são parasitoses causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (Ross, 1903). A transmissão acontece durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneo infectadas, quando as formas infectivas são regurgitadas nos hospedeiros e reservatórios. Esses vetores são representados pelos gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Atualmente, existem cerca de 12 milhões de casos de leishmanioses em todo mundo, e estima-se que outros dois milhões de novos casos ocorram a cada ano, sendo cerca de 1,5 milhões de leishmaniose tegumentar (LT) e 500.000 de leishmaniose visceral (LV) (Desjeux, 1996). As leishmanioses são prevalentes nos quatro continentes e endêmicas em 88 países. Mais de 90% dos casos de LV do mundo ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Sudão e Nepal, e mais de 90% dos casos de LT são relatados no Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Síria no Velho Mundo, e no Brasil e Peru no Novo Mundo (Desjeux, 1996; Ashford, 2000; Murray *et al.*, 2005).

A transmissão vetorial é a principal forma de disseminação do parasito, no entanto, atualmente, casos de transmissão dos parasitos envolvidos na forma visceral da doença por meio de transplantes de

órgãos (Basset *et al.*, 2005), transfusão sanguínea (Dey & Singh, 2006) e pelo compartilhamento de seringas entre usuários de drogas (Alvar *et al.*, 1996; Alvar *et al.*, 1997), têm merecido maior atenção dos pesquisadores.

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

No hospedeiro definitivo, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos, e dentro dessas células, os parasitos internalizados ficam dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), envolvido na destruição de microorganismos. No entanto, o parasito apresenta mecanismos capazes de evadir da ação microbicida do macrófago, dentre outros, se transformando em amastigotas. Inicia-se, então, o processo de multiplicação, que se estende, até a ruptura da célula, quando as amastigotas são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção. Durante este processo ocorre, ainda, a liberação de produtos antigênicos que serão apresentadas ao sistema imune, gerando uma resposta imune específica. Os mecanismos de eliminação das amastigotas pelos macrófagos ativados pelo IFN- $\gamma$ , envolvem a síntese de radicais de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico (Matlashewski, 2001; Sacks & Noben-Trauth, 2002; Peters & Sacks, 2006).

De acordo com Lainson e Shaw 1987, as espécies de *Leishmania* encontradas em mamíferos, no Novo Mundo, podem ser classificadas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Essa classificação se baseia em critérios, tais como: o potencial de crescimento em meios de cultura, a virulência dos parasitos quando inoculados em animais experimentais e o desenvolvimento do parasito no vetor. O subgênero *Viannia* é caracterizado pelo fato de os parasitos apresentarem baixo potencial de crescimento em meio de cultivo NNN convencional, baixa virulência em hamsters experimentalmente infectados e desenvolverem-se no intestino posterior do flebotomíneo. No subgênero *Leishmania*, entretanto, os parasitos crescem mais facilmente, são mais virulentos e se desenvolvem no intestino médio e anterior do vetor. No primeiro subgênero encontram-se as espécies causadoras das formas cutânea e mucocutânea da leishmaniose tegumentar nas Américas, das quais podemos citar: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni*. No subgênero *Leishmania* estão classificadas as espécies que causam as formas cutânea difusa, disseminada e localizada, representadas pela *L. (L.) mexicana* e *L.(L.) amazonensis* e as espécies causadoras da leishmaniose visceral, no Novo Mundo, representada pela *L. (L.) infantum* (Lainson & Shaw, 1987).

Vertebrados, como canídeos silvestres (*Cerdocyon thous* e *Dusicyon vetulus*) e domésticos (*Canis familiaris*), marsupiais (*Didelphis albiventris*) e roedores, principalmente dos gêneros *Rattus*, *Mus*, *Bolomys*, *Oryzomys*, *Akodon*, podem estar envolvidos no ciclo da *Leishmania* spp. (Reithinger & Davies, 1999; Cabrera *et al.*, 2003; Garg & Dube, 2006).

## **1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana**

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, presente em quase todos os países, com exceção do Chile e Uruguai (Gontijo & Carvalho, 2003; Lainson & Shaw, 2010). É uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade. Trata-se de uma afecção dermatológica, considerada zoonose primária de mamíferos silvestres e que acomete o homem de forma acidental (Gontijo & Carvalho, 2003; Desjeux, 2004; Pavli *et al.*, 2010, Lainson & Shaw, 2010).

A doença está crescendo no país devido à manutenção de focos da mesma e ao aparecimento de surtos epidêmicos relacionados a fatores, tais como: construção de estradas, expansão de

fronteiras agrícolas, invasão das periferias das cidades e implantação das áreas de garimpo (Guerra *et al.*, 2006).

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

Dentre o espectro das formas clínicas de LTA, podemos citar a forma cutânea, considerada a manifestação mais comum da leishmaniose tegumentar, causada, principalmente, pela *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo e *L. braziliensis* e *L. mexicana* no Novo Mundo (Grevelink & Lerner, 1996). A resposta imune nessa forma da doença é predominantemente mediada por células T e um infiltrado inflamatório misto no local da infecção é visível na maioria dos casos. No caso das lesões mais crônicas, com resposta imunológica mais evidente, normalmente encontram-se granulomas epitelióides com pouca quantidade de parasitos, enquanto que nas lesões crônicas e com resposta imunológica menos pronunciada observa-se um infiltrado difuso de macrófagos com grande número de parasitos (Mehregan *et al.*, 1999). Pápulas inflamatórias satélites podem se desenvolver em torno da lesão primária como uma reação à disseminação local do parasito e de seus produtos antigênicos (Weigle & Saravia, 1996). As lesões cutâneas são geralmente únicas ou em pequeno número e assintomáticas, a menos que se desenvolva no local uma infecção bacteriana, tornando-as mais inflamadas, dolorosas e purulentas (Marzochi, 1992; Vera *et al.*, 2001; Gontijo & Carvalho, 2003).

Outra forma da leishmaniose tegumentar, conhecida como forma difusa, é caracterizada como forma anérgica da doença. No Velho Mundo pode ser causada pela *L. aethiopica*, no entanto, a mais comumente encontrada é causada pela *L. amazonensis* no Novo Mundo. A doença tem início com uma lesão primária podendo ser disseminada para várias partes do corpo, e que se apresentam como nódulos não ulcerados repletos de parasitos. A resposta inflamatória limitada é

secundária, e essa forma pode ser caracterizada, ainda, pela ausência de envolvimento visceral, resposta parcial ao tratamento e recaídas frequentes (Convit *et al.*, 1993).

A forma disseminada da leishmaniose tegumentar é definida como a ocorrência de múltiplas lesões em duas ou mais áreas do corpo não contíguas, sendo uma forma mais rara, mas que têm aumentado a sua frequência no Novo Mundo. Nesse ambiente, se encontra muitas vezes associada à co-infecção com HIV e uma resposta predominante do tipo Th2 pode ser observada (Turetz *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2004; Schraner *et al.*, 2005).

Outras formas crônicas/recorrentes da LTA também raras, mas não menos importantes são: leishmaniose mucocutânea (MCL) e leishmaniose dérmica pós calazar (PKDL). A primeira possui manifestações clínicas, normalmente na superfície da mucosa do nariz, boca e faringe, e ocorre um a cinco anos após uma leishmaniose cutânea devido à infecção, normalmente, por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, no Novo Mundo; e afeta entre 1 a 10% dos casos não tratados de LTA, dependendo da espécie envolvida, localização geográfica, e outros fatores de risco. A causa das lesões cutâneas e nasofaríngeas, no Brasil, foram confirmadas, por Lindenberg, em 1909, quando ele encontrou formas idênticas à *Leishmania tropica* (Wright, 1903) em lesões cutâneas de indivíduos em São Paulo, que trabalhavam em matas. Essa foi denominada *L. braziliensis*, agente etiológico da “úlceras de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir” (Pessoa, 1982; Basano *et al.*, 2004). A segunda forma clínica é normalmente observada após uma leishmaniose visceral devido à infecção por *L. donovani* em países como Sudão e Índia (Ahluwalia *et al.*, 2004; Lawn *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2005).

### **1.3 Leishmaniose Visceral**

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença de notificação compulsória e que pode ter evolução grave, devendo ser diagnosticada precocemente (Ministério da Saúde, 2006). A leishmaniose visceral ocorre na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, sendo que, nesse último continente, 90% dos casos ocorrem no Brasil (Desjeux, 1996; Desjeux, 2004, Ministério da Saúde, 2006). O não tratamento adequado da doença pode levar a morte, podendo a letalidade alcançar o índice de 10%, nos locais em que esse quadro se instaurar (Gontijo & Melo, 2004).

Inicialmente, a LV era mais frequente no meio rural, entretanto, nos dias atuais, têm-se observado uma tendência à urbanização da endemia, devido ao aumento da frequência e intensidade da doença, nessas áreas. Em países endêmicos, o número de casos assintomáticos de LV é maior que os casos com algum tipo de manifestação clínica (Le Fichoux *et al.*, 1999; Basset *et al.*, 2005).

A LV, também conhecida como calazar trata-se de uma doença sistêmica causada pela *L. donovani* no Velho Mundo e *L. infantum* no Novo Mundo. Sinais e sintomas da doença incluem febre, esplenomegalia, emaciação, linfadenopatia, hiperglobulinemia e pancitopenia. Durante o período ativo da LV aparece o escurecimento desigual da pele explicando a origem do nome calazar, que significa febre negra. A pele normalmente se torna seca e áspera e a alopecia é frequente. O período de incubação da infecção é de normalmente dois a quatro meses, após o qual a doença passa para um curso crônico. É possível observar um aumento de IgG e IgM no soro do paciente, no entanto, uma depressão da imunidade mediada por célula predispõe o hospedeiro a infecções secundárias (Ghosh Dastidar *et al.*, 1983; Haldar *et al.*, 1983).

Os animais considerados os principais reservatórios da doença nas Américas são os canídeos domésticos e silvestres, mas no Brasil, o parasito causador da LV foi encontrado, ainda, em gatos (*Felis catus*), marsupiais (*Didelphis marsupiali* e *D. albiventris*) e roedores (*Proechymis oris*) (Sherlock *et al.*, 1984; Sherlock, 1996; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). Entretanto, ainda se desconhece o papel epidemiológico dos outros animais não canídeos, sendo o cão doméstico (*Canis familiaris*) a principal fonte de infecção para os vetores. Um fator epidemiológico importante verificado no quadro da doença é que a infecção canina é mais prevalente do que a humana, sendo que a primeira precede à segunda, em relação à ocorrência (Ministério da Saúde, 2006).

No Brasil as duas formas da doença, tegumentar e visceral, possuem ampla distribuição geográfica inclusive com áreas de sobreposição. As espécies mais frequentes e amplamente distribuídas são *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, causando a forma tegumentar e *L. (L.) infantum* causando a forma visceral. No estado de Minas Gerais a situação não difere do quadro nacional, destacando-se amplas áreas de sobreposição das formas clínicas (Ministério da Saúde 2006, 2007).

## 1.4 Diagnóstico

A faixa geográfica de ocorrência das leishmanioses tem aumentado devido à variedade de fatores climáticos, ecológicos e sociais. Tanto animais, como seres humanos podem apresentar a forma assintomática da doença dificultando assim o seu diagnóstico (Reithinger & Dujardin, 2007; Gramiccia, 2011). O tratamento efetivo da doença requer diagnóstico correto e precoce, de maneira a evitar o desenvolvimento de doença crônica e/ou de lesões desfigurantes (Van der Meide *et al.*, 2005). Diferentes métodos de diagnóstico associados são usados para a confirmação da doença, dentre os quais podemos citar: o parasitológico, o molecular e o imunológico. Os métodos parasitológicos podem ser ainda classificados em direto e indireto, enquanto os imunológicos podem ser separados em celular e sorológico.

O diagnóstico parasitológico direto da LTA é realizado por aposição de fragmentos da lesão sobre uma lâmina e posterior coloração com Giemsa e visualização das amastigotas em microscópio óptico. Dentre as vantagens, podemos destacar: o curto prazo para conclusão, o baixo custo e a execução fácil, e em relação às desvantagens podemos citar: a baixa sensibilidade e a necessidade de grande habilidade profissional (Ashford, 2000; Marfurt *et al.*, 2003; Van der Meide *et al.*, 2005).

De forma semelhante, para o diagnóstico parasitológico direto da LV é necessária a coleta de aspirados de medula óssea, baço, linfonodo ou de fígado, tornando o método invasivo. Os testes apresentam especificidade que pode atingir aproximadamente 100%, mas, a sensibilidade é variável, ficando entre, 55-97% em material de medula óssea, 95% em aspirados esplênicos e 60% em linfonodos (Murray *et al.*, 2005; Singh, 2006). A coleta de material para o diagnóstico necessita de profissional experiente e bem treinado; e sendo o procedimento de difícil execução, deve ser realizado em locais especializados. Em algumas situações, como de anemia grave, de tendência à hemorragia ou em casos de gravidez, a técnica é contra-indicada (Desjeux, 2004). A punção de baço e fígado pode ser complicada e às vezes fatal (Siddig *et al.*, 1988; Zijlstra *et al.*, 1992), sendo a utilização do aspirado de medula óssea considerada a mais segura (Kafetzis & Maltezou, 2002).

Outra metodologia usada e caracterizada como forma direta de diagnóstico parasitológico são as técnicas rotineiras de histologia e /ou imuno-histoquímica, que, também se baseiam na detecção das amastigotas em fragmentos de tecidos (biópsias). Essas foram realizadas em amostras de cães (Livni *et al.*, 1983; Ferrer *et al.*, 1988; Bourdoiseau *et al.*, 1997; Tafuri *et al.*, 2004) e em amostras de humanos (Livni *et al.*, 1983; Barbosa *et al.*, 1988; Salinas *et al.*, 1989; Kenner *et al.*, 1999; Quintella *et al.*, 2009). Uma técnica imuno-histoquímica descrita por Tafuri *et al.* 2004 utilizando soro hiperimune de cão naturalmente infectado com *L. infantum*, como anticorpo primário, tornou a mesma mais aplicável, de menor custo e mais rápida, quando comparado com as que usam anticorpos monoclonais ou policlonais anti-*Leishmania*. A detecção é feita utilizando anticorpo secundário biotilado de cabra anti-camundongo e anti-coelho. Um fator importante e que influi na sensibilidade desse tipo de teste é o sistema de detecção usado (Ramos-Vara *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2009), e o mais comumente empregado nas técnicas de imuno-histoquímica é o da estreptoavidina-biotina peroxidase (Ramos-Vara *et al.* 2008).

Como diagnóstico parasitológico indireto, temos o cultivo dos parasitos, realizado a partir do material aspirado ou de biópsia, e que pode ser usado como forma de aumentar a sensibilidade do diagnóstico. A cultura desses tecidos é geralmente realizada em meios como: meio líquido de LIT- “liver infusion tryptose” ou de Schneider, e meio de NNN – “Novy MacNeal-Nicolle”, ficando os índices de positividade da cultura de aspirado medular, entre 40-50%, enquanto que a de aspirado esplênico situa-se em torno de 70-98% (Singh & Sivakumar, 2003). Entretanto, é uma técnica que requer dias ou semanas para a conclusão do resultado, sendo essa uma desvantagem do método (Murray, 2000), e raramente usado para LT, exceto em trabalhos de pesquisa que pretendem identificar a espécie do parasito.

Outra forma indireta de diagnóstico da doença é a inoculação do material de biópsia em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e a posterior confirmação da presença do agente, mas é uma maneira também prolongada (Cuba *et al.*, 1986; Cuba *et al.*, 1986; Sampaio *et al.*, 2002).

O xenodiagnóstico, também considerado um método diagnóstico parasitológico indireto, consiste em uma metodologia que necessita dos vetores para sua conclusão e é realizado em cães com

suspeita de LV. Nesse, flebotômíneos, sabidamente isentos de parasitos, são colocados para alimentarem-se em cães suspeitos, e dias após essa atividade, os insetos são dissecados e seu conteúdo intestinal avaliado em relação à presença das formas flageladas. Trata-se de um método sensível e específico, mas pouco usual, por se tratar de uma técnica muito dispendiosa (Gradoni & Gramiccia, 2008).

As técnicas moleculares são metodologias inovadoras para o diagnóstico das leishmanioses e estão sendo desenvolvidas e aprimoradas. Dentre elas, podemos destacar a amplificação de alvos gênicos, conhecida como reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes (PCR multiplex, nested-PCR, RT-PCR, PCR quantitativo) (Britto *et al.*, 2005; Cupolillo, 2005). Essas são consideradas muito sensíveis, sendo capazes de detectar o alvo, mesmo que ele esteja em quantidade mínima nas amostras clínicas analisadas, sendo uma vantagem da técnica. Além desse, outros fatores positivos dos métodos moleculares são que as amostras podem ser coletadas de maneira menos invasiva, e há geração de um resultado seguro num pequeno intervalo de tempo (Ikonomopoulos *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004). Entretanto, trata-se de uma técnica ainda onerosa, que depende de pessoal laboratorialmente treinado e qualificado e, portanto, pouco empregada na rotina do diagnóstico da doença.

Dentre a última categoria dos métodos de diagnóstico, temos os métodos imunológicos, que podem ser agrupados em: celulares e sorológicos, sendo o primeiro deles mais adequado para LTA e o segundo para LV.

Para o diagnóstico imunológico da LTA, o teste intradérmico ou intradermorreação de Montenegro, baseado na hipersensibilidade celular tardia, é muito usado e apresenta especificidade e sensibilidade satisfatórias (Reithinger & Dujardin, 2007). Nesse teste, 0,1mL de antígeno bruto é inoculado na região anterior do antebraço, e a leitura é realizada entre 48 e 72 horas, com a aferição do tamanho da área de induração formada, no caso de positivo ou falso positivo. Nos locais endêmicos, a reação positiva pode ser devido à doença ou inoculação do antígeno, anteriormente, além da exposição ao parasito sem doença, alergia ao diluente, ou ainda reação cruzada com outras doenças (Montenegro, 1926; Carvalho *et al.*, 1995). A mesma pode ser negativa entre quatro a seis semanas após o surgimento da lesão na pele. A reação pode ser exacerbada no caso da forma mucocutânea ou

negativa na forma difusa e em pacientes imunossuprimidos (Melo *et al.*, 1977; Souza *et al.*, 1992). Uma desvantagem do método é requerer cultura do parasito para produção do antígeno, visto que, o preparo de origem diferente pode impactar na sensibilidade da técnica. Esse método não é usado para diagnóstico de LV (Reithinger & Dujardin, 2007).

Os métodos sorológicos são indicados para o diagnóstico da LV, tendo em vista os elevados níveis de anticorpos que podem ser observados em pacientes que apresentam essa forma da doença (Burns *et al.*, 1993). Dentre eles, podemos destacar: o ELISA, a RIFI, o DAT e o teste imunocromatográfico.

A primeira técnica, ELISA, é sensível e de especificidade dependente do antígeno utilizado (Mancianti *et al.*, 1995; Gradoni & Gramiccia, 2008). Embora vários antígenos venham sendo testados (Soto *et al.*, 1996; Sundar & Rai, 2002; Singh & Sivakumar, 2003), o antígeno total, derivado do lisado de promastigotas de *Leishmania* spp, é o mais usado. O antígeno recombinante K39, pertencente à superfamília das cinesinas, que são proteínas motoras da *Leishmania* spp, também é usado para a realização da técnica, apresentando um menor número de reações cruzadas, quando comparado à utilização do antígeno bruto (Carvalho *et al.*, 2003).

O segundo método, RIFI, é realizado por meio de uma diluição seriada do soro do hospedeiro suspeito, que são posteriormente colocados em contato com uma lâmina sensibilizada com as formas promastigotas do parasito. A ligação, entre o parasito e o anticorpo, é revelada após ser adicionado um anti-anticorpo conjugado com molécula emissora de fluorescência. (Gradoni & Gramiccia, 2008).

Mas mesmo para o diagnóstico da LV, esses testes apresentam dificuldades como as reações cruzadas e sensibilidade e especificidade dependentes do antígeno utilizado (Da Costa *et al.*, 1991; Cardoso & Cabral, 1998).

O teste de aglutinação direta (DAT) consiste em um diagnóstico sorológico que se baseia na reação do parasito com o soro do paciente ou cão com suspeita da doença. Apresenta alta sensibilidade e especificidade e dispensa equipamentos sofisticados para sua execução, entretanto é muito demorado (Harith *et al.*, 1989; Saul & Semião 1996; Reithinger *et al.*, 2002; Mohebalí, 2004).

O teste imunocromatográfico consiste em um teste sorológico considerado simples e interpretação visual das reações, apresentando valores de sensibilidade e especificidade que variam de 67 a 100% e de 59 a 100%, respectivamente (Sundar *et al.*, 1998; Bern *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2003; Ritmeijer *et al.*, 2006). Na membrana de nitrocelulose da fita imunocromatográfica é adsorvido o antígeno, formando a linha teste, e o anticorpo anti-IgG humano constituindo a linha controle. O soro do paciente é colocado em contato com a fita e adsorvido pela membrana em fluxo ascendente. O teste é considerado positivo quando é possível visualizar as duas linhas, teste e controle; e negativo, quando somente a linha controle é visualizada na membrana de nitrocelulose (Assis *et al.*, 2008). Dentre os testes validados, podemos destacar o IT- Leish, para LV humana (Assis *et al.*, 2008) e DPP® - *dual path platform* para LV canina (Grimaldi *et al.*, 2012).

## 1.5 Controle

A diversidade epidemiológica das diferentes formas da doença impossibilita o seu controle utilizando uma única metodologia ou ferramenta. Na leishmaniose antroponótica visceral e cutânea, nas quais o homem atua como fonte de infecção, o diagnóstico e tratamento precoces funcionariam como boas ferramentas de controle (Desjeux, 1996). Nesse contexto, para que o controle funcione, é necessário associação do diagnóstico e tratamento precoces ao controle vetorial, realizado por borrifação de inseticida no intra e no peridomicílio.

O tratamento é preconizado para todas as formas clínicas da leishmaniose tegumentar, principalmente para os pacientes que apresentam maiores chances de ser acometidos pela forma mucosa da LTA. O controle vetorial não é recomendado, tendo em vista que na sua maioria, são selváticos, exceto, no que diz respeito a medidas de proteção individuais como: o uso de redes impregnadas com inseticidas, o uso de repelentes, o uso de roupas adequadas, quando necessário, e ainda a construção de residências, com distância mínima de 400m das matas. O controle de possíveis reservatórios também não é viável, pois, assim como os vetores, esses são em sua maioria selvagens (Desjeux, 1996).

Para a LV o controle vetorial parece ser o mais eficiente na prevenção da infecção (David *et al.*, 2001). Como exemplo, podemos citar o uso de colares impregnados com deltametrina em cães, sendo

que a eficiência do método varia de acordo com a cobertura dos cães (Reithinger *et al.*, 2004). Entretanto, a técnica não é usada com frequência em cães que vivem em áreas rurais e nos subúrbios, provavelmente em decorrência do custo. O subsídio do poder público para o controle dos vetores nessas áreas, seja com a metodologia citada anteriormente, ou outra, poderia ser realizado e obter resultados relevantes (Otranto *et al.*, 2007).

Outra estratégia de controle da forma zoonótica da LV adotada no Brasil é a eutanásia de cães soropositivos para LV (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006). Entretanto, tal conduta, além de ser eticamente questionável, tem se mostrado limitada em relação ao impacto na incidência da leishmaniose visceral humana (Dietze *et al.*, 1997). Dentre os fatores que podem estar envolvidos na falha do método de controle, podemos citar: a eutanásia de cães isentos de infecção, a não detecção de cães positivos pelos métodos usados e ainda, a velocidade com que novos cães ocupam a posição de reservatórios, levando à manutenção do ciclo de transmissão da doença (Moreira *et al.*, 2004; Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006; Nunes *et al.*, 2008).

## 1.6 Proteômica

Uma das grandes inovações prometidas pelo conhecimento dos proteomas, além do mapeamento de intrincados caminhos metabólicos celulares, é a possibilidade de identificar novos alvos terapêuticos, novas moléculas bioativas e marcadores biológicos que possam ser usados para diagnóstico, prognóstico de doenças ou ainda como candidatos a imunógenos de vacinas.

Estudos do proteoma de *Leishmania* foram realizados principalmente para comparação dos diferentes estágios do ciclo de vida de *L. donovani* (El Fakhry *et al.*, 2002; Avila *et al.*, 2003), *L. infantum* (Gongora *et al.*, 2003), *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* (Palatnik-de-Sousa, 2008). Recentemente, um estudo utilizando 2-DE de extrato de promastigotas de *L. infantum*, seguido de western blot com soro de coelhos imunizados e análise por EM, permitiu a identificação de várias proteínas antigênicas relevantes (Dea-Ayuela *et al.*, 2006). Numa abordagem semelhante, foram identificados vários antígenos de *L. donovani* utilizando soros e parasitos isolados de pacientes indianos permitindo concluir que a abordagem proteoma-sorologia produz uma compreensiva e altamente resolvida representação da antigenicidade de *L. donovani* e da especificidade da resposta imune anti-*leishmania* em pacientes com LV (Forgber *et al.*, 2006).

Em síntese, os estudos proteômicos com *Leishmania* já demonstraram a diferença de expressão protéica entre amastigotas de cultivo “in vitro” e promastigotas e a possibilidade de utilização da “sorologia proteômica” como uma abordagem adequada para mapeamento da antigenicidade na leishmaniose. Inclusive, nosso grupo publicou recentemente (Costa *et al.*, 2011) um estudo proteômico de *L. infantum* comparando a expressão diferencial de proteínas entre formas amastigotas e promastigotas por meio da tecnologia de DIGE (differential gel electrophoresis) e ainda a identificação de proteínas imunogênicas nessa espécie associando a 2-DE (eletroforese bi-dimensional) e western blot com soros caninos. Essa abordagem nos permitiu identificar novos alvos para diagnóstico e vacina na leishmaniose visceral canina. Entretanto, os trabalhos acerca da antigenicidade das proteínas nas várias espécies de *Leishmania* mais frequentes no Brasil ainda são raros.

## 2 Justificativa

O diagnóstico preciso das leishmanioses tem implicação em diversos aspectos clínicos e epidemiológicos, como por exemplo, avaliação das medidas de controle, eficácia de tratamento, diminuição da morbi-mortalidade, dentre outros. Entre os métodos mais usados no diagnóstico da LTA, podemos citar: métodos parasitológicos, empregados devido à facilidade em coletar o material e o teste de Montenegro, baseado no desenvolvimento de uma resposta celular mais ou menos intensa, dependendo da forma clínica, visto tratar-se de um método de realização e interpretação simples. No caso da LV, os testes sorológicos são os mais comumente realizados, devido aos altos níveis de anticorpos em pacientes que apresentam essa forma da doença. Entretanto, o diagnóstico de certeza, em ambas as formas, é o parasitológico, mas a visualização do parasito apresenta alguns obstáculos como: escassez de parasitos em amostras teciduais, qualidade das amostras, dificuldade no diagnóstico morfológico dos mesmos, necessidade de pessoal técnico capacitado, entre outros fatores.

Nesse cenário, a detecção imuno-histoquímica de formas amastigotas de *Leishmania* em seções de tecido fixadas em formalina e/ou incluída em parafina vem sendo, rotineiramente, utilizado em muitos laboratórios (Livni *et al.*, 1983; Ferrer *et al.*, 1988; Bourdoiseau *et al.*, 1997, Tafuri *et al.*, 2004). Assim, Tafuri *et al.*, 2004 demonstraram uma abordagem alternativa de imuno-histoquímica eficiente e menos dispendiosa na qual o soro de cão naturalmente infectado com *Leishmania (L.) infantum* (soro hiperimune) é utilizado como anticorpo primário, seguido por um sistema de detecção com anticorpo secundário biotinizado de cabra anti-camundongo e anti-coelho, e revelação por estreptavidina-peroxidase. Segundo os autores, trata-se de um método de grande potencial para estudos clínicos, epidemiológicos e histopatológicos.

Alguns trabalhos demonstraram as relações de especificidade e sensibilidade do teste alternativo da imuno-histoquímica (IHC), desenvolvido por Tafuri *et al.* 2004. Xavier *et al.*, 2006 trabalhando com biópsias de pele obtidas de diferentes regiões anatômicas (orelha, nariz e abdômen) de vinte e nove cães naturalmente infetados com *L. infantum* encontraram uma sensibilidade 82.8% para PCR, 62.1% para IHC (técnica desenvolvida por Tafuri *et al.*, 2004) e 44.8 % para HE. Uma boa correlação positiva foi encontrada entre o PCR e a IHC não ocorrendo diferença significativa entre as duas técnicas de diagnóstico. Queiroz *et al.*, 2010 demonstraram a associação de técnicas

sorológicas, moleculares e parasitológicas, incluindo a imuno-histoquímica para o diagnóstico da LVC e concluíram que a eficiência dos testes variou de acordo com a evolução da doença, demonstrando a necessidade da associação de técnicas; usando-se IHQ para confirmação da sorologia e a PCR apenas nos casos suspeitos após a IHQ. Assim, pode-se aumentar os níveis de positividade e contribuir para o controle da doença. Em trabalho mais recente, Amorim *et al.*, 2011 confirmaram os dados de Xavier *et al.*, 2006 a respeito da correlação entre o PCR e a IHQ, e ainda, demonstraram que cães sintomáticos com IHQ positiva (biópsia de pele de orelha) tem capacidade infectante a flebotomíneos mediante avaliação do método parasitológico do xenodiagnóstico.

O uso da técnica preconizada por Tafuri *et al.*, 2004 na LTA tem sido avaliado. De fato, Alves, 2011 buscou identificar as formas amastigotas nas lesões de pele para o diagnóstico da LTA e demonstrou elevada sensibilidade quando comparada com a pesquisa do parasito através da coloração pela hematoxilina-eosina (HE), e com a imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-LPG. Apesar da maior positividade da PCR, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Concluiu-se, portanto, que o teste de Tafuri *et al.*, 2004 exibiu elevada sensibilidade, baixo custo, rapidez e facilidade na execução, quando comparada com as outras técnicas usadas.

Em síntese, as leishmanioses necessitam de avanço no diagnóstico parasitológico e tem-se demonstrado que o teste imuno-histoquímico é promissor tanto na forma visceral quanto na tegumentar. Por vezes um teste de alta sensibilidade é o desejado para triagem e detecção precoce dos casos e noutras a alta especificidade é determinante para o prognóstico e delineamento das áreas de ocorrência de cada forma clínica. Considerando o potencial da técnica imuno-histoquímico preconizada por Tafuri *et al.*, 2004, há necessidade de identificar os antígenos reativos permitindo assim entender porque o teste funciona em ambas as formas da doença, tegumentar ou visceral.

Como sabemos, a proteômica representa o desafio do futuro para aumentar nosso conhecimento sobre a célula e, a eletroforese bi-dimensional (2-DE), é uma das ferramentas para estudar a expressão de proteínas em larga escala (Thiel & Bruchhaus, 2001; Haseloff, 2003). A análise das proteínas

utilizando 2-DE envolve a separação sistemática, identificação e quantificação de muitas proteínas simultaneamente a partir de uma única amostra. Essa técnica também é capaz de detectar modificações pós-traducionais, as quais não podem ser observadas por sequenciamento do genoma. A 2-DE é uma ferramenta poderosa e amplamente utilizada para análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas e é complementada pela espectrometria de massa (EM) para identificação das proteínas.

Portanto, o que propomos é uma caracterização proteômica dos antígenos que são reativos na técnica de imuno-histoquímica, e que são compartilhados ou específicos para as três espécies de *Leishmania* mais frequentes em nossa região: *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Dessa forma, esse trabalho justifica-se pela importância de compreender melhor essa metodologia, que é eficiente e menos dispendiosa para o diagnóstico das formas tegumentar e visceral da leishmaniose e por abrir perspectivas quanto à identificação de antígenos a serem alvos de novos testes com maiores valores de sensibilidade e/ou especificidade.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Identificar os antígenos de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* reativos no método alternativo da imuno-histoquímica.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 1) Comparar o perfil proteômico das três espécies de *Leishmania*;
- 2) Selecionar as proteínas das espécies citadas que são reativas para os anticorpos do teste imuno-histoquímico;
- 3) Identificar as proteínas das três espécies que são simultaneamente ou isoladamente reativas ao soro.

## **4 Materiais e Métodos**

### **4.1 Parasitos e cultura**

As promastigotas de *Leishmania braziliensis*, cepa: MHOM/BR/1975/M2904, *L. amazonensis*, cepa: IFLA/BR/1967/PH8 e *L. infantum*, cepa: MHOM/BR/1972/BH46 usadas no estudo foram cultivadas e mantidas em meio LIT, suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico, penicilina e estreptomicina, em estufa B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 26 °C. Foram realizados repasses sucessivos até que a curva de crescimento das culturas atingisse  $1 \times 10^7$  parasitos por mL. Para cada espécie de *Leishmania* foram realizados no mínimo três crescimentos independentes e simultâneos. A contagem dos parasitos foi feita em câmara de Neubauer e, posteriormente, procedeu-se três lavagens sucessivas usando meio RPMI não suplementado, por meio de centrifugações de 15min, a 4°C e 3000 rpm. Os tubos com os parasitos foram acondicionados em freezer -70°C, devidamente identificados até o seu uso.

### **4.2 Extração de proteínas**

A extração de proteínas foi realizada resuspendendo os parasitos em tampão de lise (8 M uréia, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 65mM dithiothreitol (DTT), 40 mMTris base, e “MIX” de inibidor de protease, GE Healhtcare, San Francisco,CA). Em seguida, as amostras foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação de 20rpm. Após esse período, a solução contida no tubo passou por um processo de lise mecânica utilizando uma agulha 26G, o conteúdo foi, então, centrifugado por 30 minutos a 5000 rpm e o sobrenadante aliqotado e acondicionado no freezer -70°C. As proteínas contidas no extrato foram dosadas usando o 2D-Quant kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

### **4.3 Eletroforese Bidimensional (2DE)**

As amostras foram diluídas em tampão IEF (8M Uréia, 2M Tiouréia, 4% CHAPS, 0,0025% Azul de Bromofenol), de modo que a quantidade de proteínas fosse de 200µg para as *strips* de 7cm e 900 µg para as de 18cm, e 1 % de IPG buffer, totalizando 125 µL e 340 µL, e aplicadas em *strips* de 7 e 18cm, respectivamente, da Immobiline™ DryStrip com pH 4–7 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Após hidratação passiva, a focalização isoeétrica se deu com os seguintes passos: passo 1 - 500V por

1h e 30 min; passo 2 - 1000V por 1h; passo 3 – 5000V até acumular 4000Vh; passo 4 –5000V, até acumular 16000Vh; passo 5 – 500V por 1 h; passo 6 – 500V(hold), para as *strips* de 7cm e passo 1 - 500V por 6h; passo 2 - 1000V por 1h e 30min; passo 3 – 8000V por 2h; passo 4 – 8000V, até acumular 40000Vh; passo 5 – 500V por 1 h; passo 6 – 500V(hold) – para as *strips* de 18 cm . Após a focalização isoeétrica, as *strips* foram equilibradas com Tampão de Equilíbrio (50 mM de Tris 1,5M pH 8,8, 6M Uréia, 30% Glicerol, 2% SDS, 0,001% Azul de Bromofenol) contendo DTT (Ditiotreitol) por 15 minutos sob leve agitação. E posteriormente, com Tampão de Equilíbrio contendo IAA (Iodoacetamida) ao invés de DTT, nas mesmas condições. As *strips* foram então transferidas para um gel de poliacrilamida a 12% para eletroforese nas seguintes voltagens: 70 volts por 15 minutos e 120 volts até o fim da corrida, para os géis de 7cm; e 50 volts/gel e 25mA/gel por 15 minutos e 100 volts/gel e 50mA/gel até o fim da corrida, para os géis de 18 cm. Os géis foram fixados e corados com Coomassie brilliant blue G-250 de acordo com Neuhoff, 1988. Os géis foram digitalizados utilizando o *ImageScanner* (GE Healthcare) e as imagens analisadas por meio do programa *Image Master 2D Platinum 5.0* (GE Healthcare).

#### **4.4 Western blot – 2D gel**

O Western blot (WB) foi realizado a partir de gel 2DE. A eletroforese bi-dimensional foi realizada conforme descrito anteriormente, exceto com relação à coloração por Coomassie G250. As proteínas dos géis de cada uma das espécies foram transferidas para membrana de nitrocelulose, GE Healthcare Amersham Hybond – ECL, utilizando o equipamento Semidry-transfer Unit (GE Healthcare) e incubadas com uma solução de bloqueio (6% de leite desnatado Molico em PBS/ Tween 0,05%) a 4°C por 24 horas. Posteriormente, as membranas foram incubadas com soro hiperimune de um cão naturalmente infectado com *L. infantum*, proveniente do Centro de Controle de Zoonoses de Ribeirão das Neves, previamente diagnosticado com leishmaniose visceral pelos testes de RIFI - Kit Biomanguinhos<sup>®</sup> e ELISA, diluído 1: 200 em BSA 0,1%, como anticorpo primário, por duas horas. Em seguida foram realizadas três lavagens de cinco minutos cada, com PBS/Tween 0,05%. Como anticorpo secundário foi utilizado soro biotilado de cabra anti IgG-coelho e anti IgG-camundongo (Link-DAKO, LSAB2 Kit, Catalog # K0675-1; Carpinteria, California, USA), cuja incubação se deu, também, por duas horas. Em seguida, foram realizadas três lavagens de cinco minutos cada, com PBS/Tween 0,05%, e por fim, a revelação foi realizada com complexo estreptavidina peroxidase (DAKO, LSAB2 Kit, Catalog # K0675-1; Carpinteria, California, USA), cuja incubação se deu por

30 minutos, e solução de 0,024% diaminobenzidina (DAB; Sigma, St. Louis, USA) e 0,16% de peróxido de hidrogênio 40 v/v. Como controle negativo utilizou-se *pool* de cinco soros de cães não infectados, provenientes do centro de controle de zoonoses da região não endêmica de Carandaí, MG.

As membranas foram digitalizadas utilizando o *ImageScanner* (Amersham Biosciences) e as imagens analisadas por meio do programa Image Master 2D Platinum 5.0 (GE Healthcare).

#### **4.5 Análise de reprodutibilidade dos géis e membranas**

Foram realizados três experimentos utilizando *strips* de 7cm da seguinte maneira: cada experimento foi realizado com seis géis 2-DE (2 para cada espécie de *Leishmania*). Destes, três (um de cada espécie) foram transferidos para a membrana de nitrocelulose para western blot e os outros (também um de cada espécie) foram corados, conforme já descrito. O western blot foi conduzido conforme protocolo tradicional de (Towbin & Gordon, 1979), com a diferença que o gel foi 2-DE.

O processo de detecção foi realizado conforme o teste imuno-histoquímico em membrana de nitrocelulose ao invés de corte de tecido, e com as diluições adequadas do soro e reagentes usados na revelação, conforme padronizado.

As membranas e os géis corados foram digitalizados e as imagens analisadas de forma a identificar os índices de correlação entre as amostras independentes de cada espécie estudada, para os géis e membranas. Os géis foram usados, ainda, para conhecer o perfil proteômico de cada uma das espécies.

#### **4.6 Seleção das proteínas antigênicas**

Posteriormente foram realizados outros três experimentos utilizando *strips* de 18cm da seguinte maneira: cada experimento foi realizado com quatro géis 2-DE, da mesma espécie de *Leishmania*. Destes, um foi transferido para a membrana para western blot e os outros foram corados, conforme já descrito. As membranas e os géis foram, também, digitalizados, e para os géis buscou-se conhecer os índices de correlação entre as amostras independentes da mesma espécie.

Utilizando as membranas e os géis digitalizados foi identificada a posição das proteínas no gel reveladas no WB, para cada espécie, utilizando como referência os marcadores de ponto isoelétrico (pI) e de massa molecular (MM). As imagens foram processadas e as réplicas das imagens dos géis e membrana de um mesmo antígeno foram alinhadas. Foi realizada, então, a seleção dos *spots* que foram reconhecidos no western blot em cada espécie e por todas as espécies simultaneamente, excluindo as reações inespecíficas detectadas pelo controle negativo. Os *spots* selecionados foram retirados dos géis para identificação por EM.

#### **4.7 Identificação das proteínas**

Os *spots* foram retirados do gel manualmente e colocados individualmente em tubos de 1,5mL. Os mesmos foram lavados três vezes por 15 minutos cada com 400µl de bicarbonato de amônio a 25mM e 50% v/v de acetonitrila. A solução descorante foi retirada e os fragmentos de géis desidratados com solução de acetonitrila por 5min. Após os fragmentos secarem, os mesmos foram reidratados com 10µl de tripsina (Promega), a 20 ng/µl em 25mM de bicarbonato de amônio por 16 h a 37°C. A solução de tripsina contendo os peptídeos extraídos foi retirada de cada um dos tubos e armazenada em tubos de 0,6mL, devidamente identificados. Os fragmentos dos géis foram lavados duas vezes, por 15 minutos, com 30µl de 50% acetonitrila/5% ácido fórmico. Em seguida, essa solução foi também colocada juntamente com o material digerido por tripsina e, posteriormente, concentrado em SpeedVac (Savant) a um volume de aproximadamente 10µl. Por fim, as soluções concentradas de cada um dos spots foram dessalinizadas usando Zip-Tip<sup>®</sup> (C18 resina; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Os peptídeos foram eluídos da coluna com solução de acetonitrila 50% /ácido trifluoracético 0,1% e congelados a -20°C até o momento do uso.

As amostras foram misturadas à matriz [10mg/mL de R-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Aldrich, Milwaukee, WI) em acetonitrila 50%/ácido trifluoracético 0,1%] e aplicadas na placa para análise no MALDI/ToF-ToF (Bruker, AUTOFLEX, 3.0). Ambos MS e MS/MS foram adquiridos com o laser neodmium-doped yttrium aluminum garnet (Nd:YAG) com 200-Hz. Os espectros foram editados usando os programas FlexAnalysis e Biotools. A busca foi realizada através do programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), usando o banco de dados do National Center for Biotechnology (NCBI). Os parâmetros de busca foram: tolerância de desvio de massa molecular entre 100-200ppm, carbamidometilação, máximo de um sítio tríptico de corte não clivado e oxidação da metionina.

## 5 Resultados

### 5.1 Dosagem das proteínas

As proteínas extraídas dos precipitados das culturas de *Leishmania amazonensis*, *L.braziliensis* e *L. infantum* foram dosadas usando o 2D-Quant kit(GE Healthcare). Os resultados da dosagem obtidos estão representados na tabela 1.

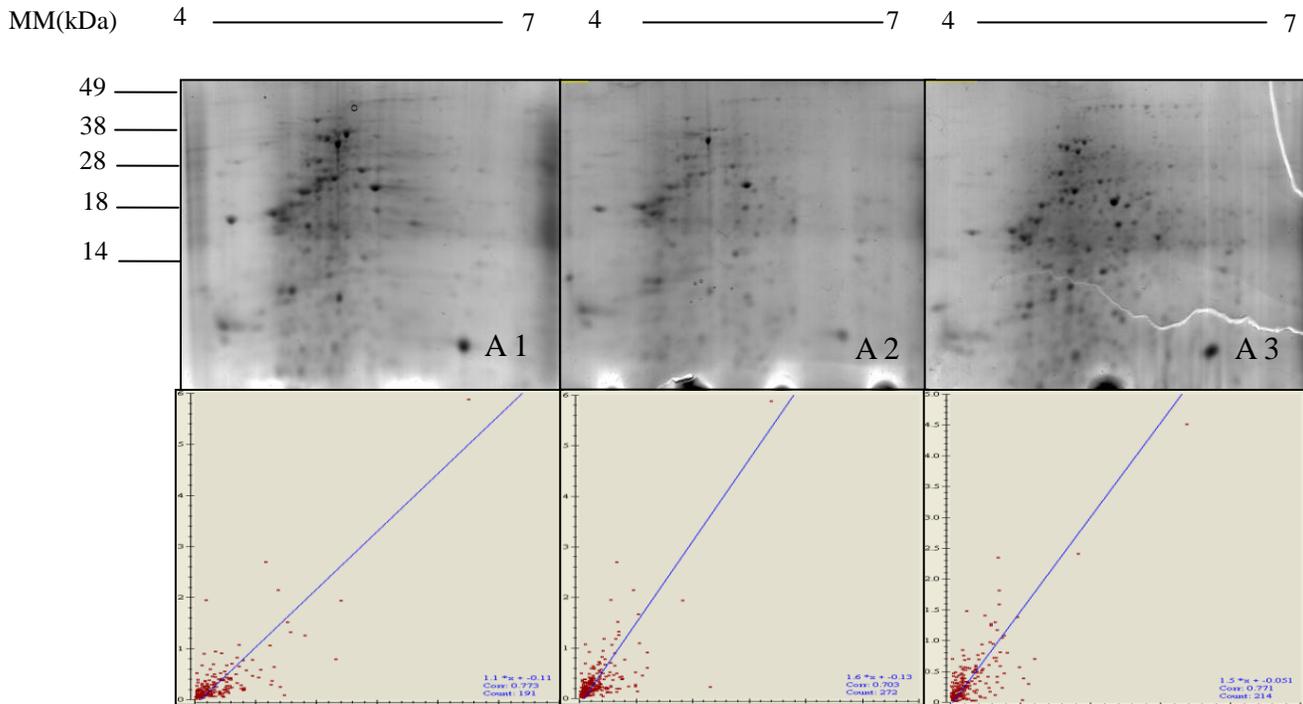
**Tabela 1:** Valores da dosagem das proteínas das amostras de *Leishmania amazonensis* (PH8), *L.braziliensis* (2904) e *L. infantum* (BH46) usando o 2D-Quant kit(GE Healthcare).

Espécie	Crescimento	Dosagem µg/µl
<i>L.infantum</i> BH 46	1	26,4
	2	23,7
	3	16,18
	4	16,7
<i>L. amazonensis</i> PH 8	1	22,7
	2	19,79
	3	23,7
	4	26,87
<i>L. braziliensis</i> 2904	1	6,23
	2	7,04
	3	3,28
	4	2,91

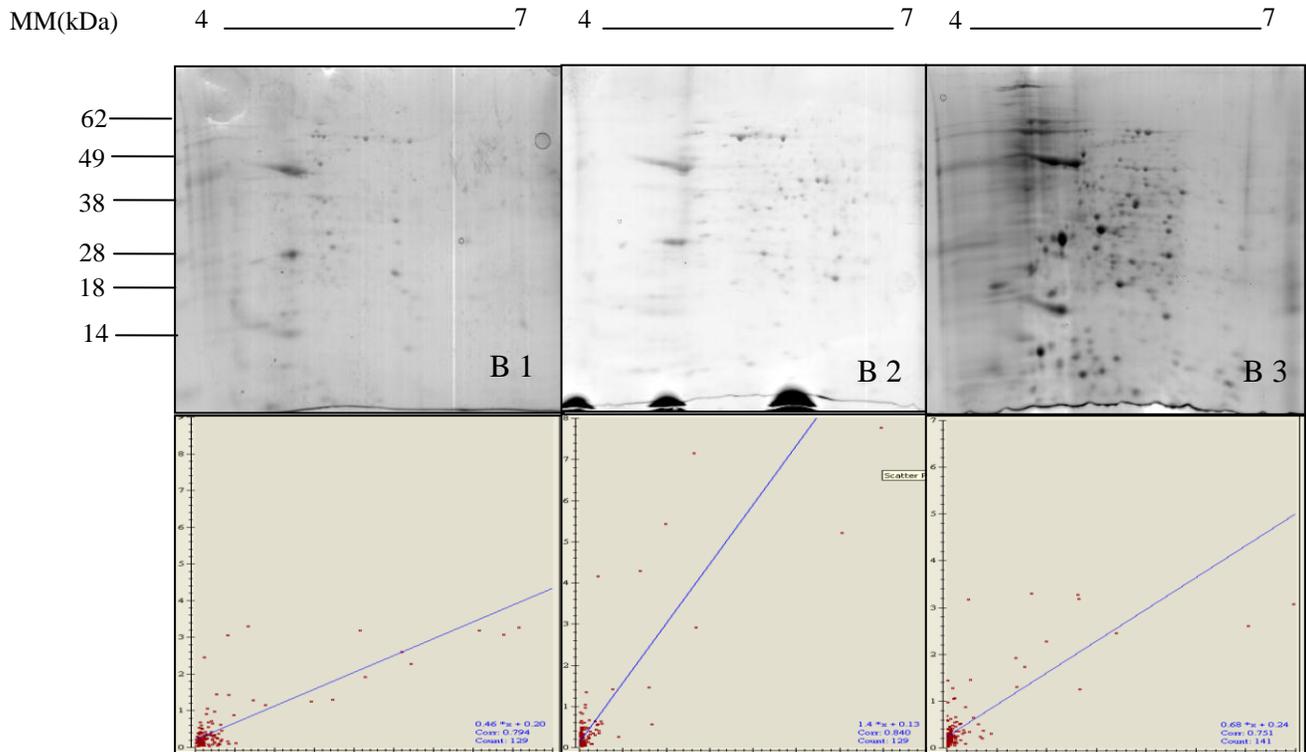
### 5.2 Determinação dos perfis protéicos de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L.infantum*

Para a determinação dos perfis protéicos e avaliação dos índices de correlação entre os diferentes géis de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* foram realizados três experimentos. Em cada um deles foram usadas *strips* de 7 cm com 200 ug de proteína, pH variando de 4 a 7 e géis de 12% corados por Coomassie Brilliant blue. A avaliação da reprodutibilidade entre os géis foi realizada utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum.

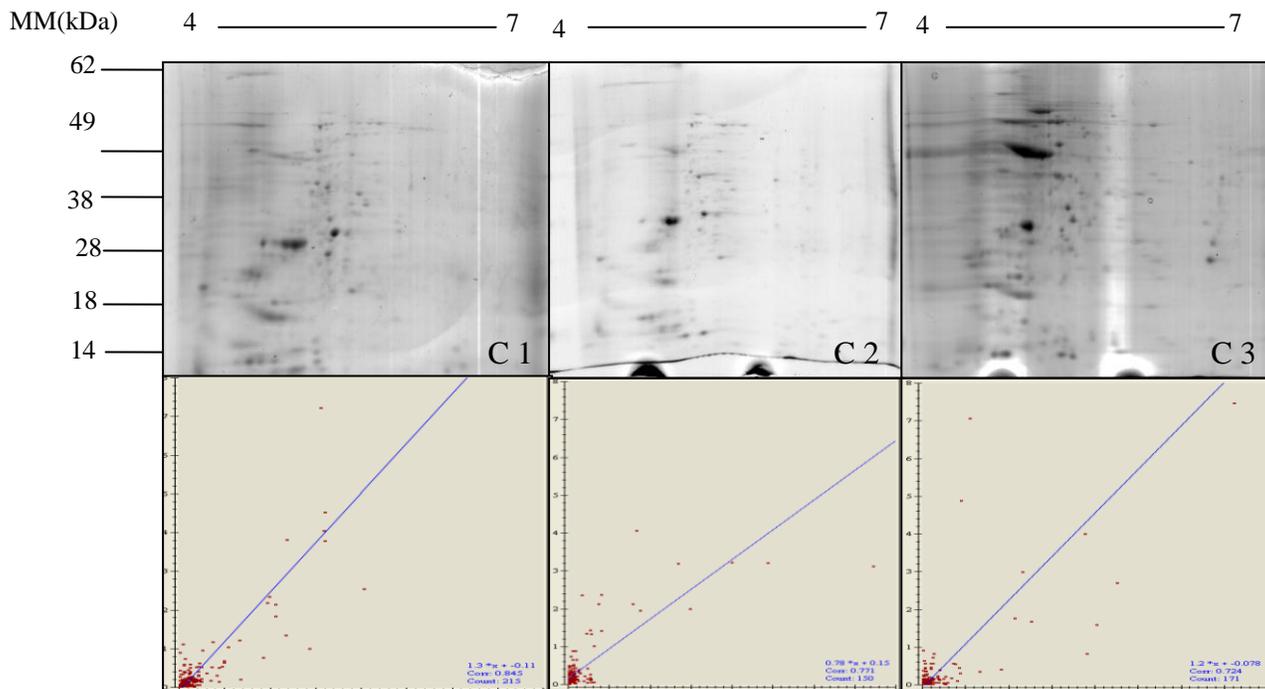
As Figuras 1A, 2A e 3A mostram o perfil protéico obtido a partir do extrato de *Leishmania amazonensis* (PH8), *L.braziliensis* (2904) e *L. infantum* (BH46), respectivamente, a partir de amostras de três cultivos independentes bem como os gráficos de correlação entre os géis. A correlação indica a similaridade da % de volume dos *spots* correspondentes a cada 2 géis e nos permite inferir sobre a reprodutibilidade dos perfis protéicos.



**Figura 1** : Géis 2DE de 7 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, corados por Coomassie Brilliant blue G250. A1, A2 e A3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L. amazonensis*. Abaixo, gráficos demonstrando os índices de correlação entre os géis.



**Figura 2:** Géis 2DE de 7 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, corados por Coomassie Brilliant blue G250. B1, B2 e B3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L.braziliensis*. Abaixo, gráficos demonstrando os índices de correlação entre os géis.



**Figura 3:** Géis 2DE de 7 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, corados por Coomassie Brilliant blue G250. C1, C2 e C3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L.infantum*. Abaixo, gráficos demonstrando os índices de correlação entre os géis.

O experimento foi dividido em três etapas e foram obtidos três géis de cada uma das espécies. Observou-se que os géis 2-DE dos extratos de *L. amazonensis* apresentaram uma média de 378 *spots* e o índice de correlação entre os géis variou de 70,3% a 77,3%. Para *L. braziliensis* a média de *spots* visualizados foi de 363 com índice de correlação de 75,1% a 84% e nos géis de *L. infantum* foram observados uma média de 428 *spots* com índice de correlação de 72,4% a 84,5%. Esses dados estão representados na tabela 2 indicando uma boa reprodutibilidade entre os géis, bem como a caracterização do perfil protéico para cada espécie analisada.

**Tabela 2:** Número de *spots* obtidos para *Leishmania amazonensis* (PH8), *L. braziliensis* (2904) e *L. infantum* (BH46), número médio de *spots* e percentual de correlação entre os géis comparados para cada espécie.

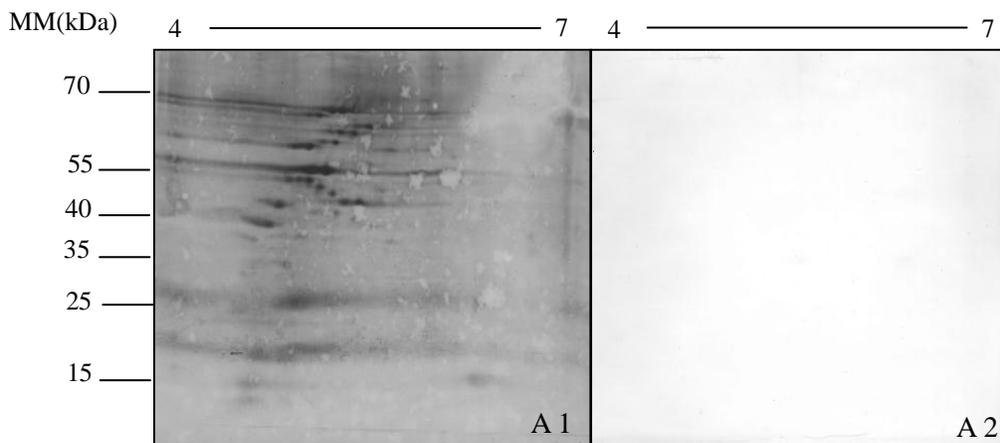
Espécie	Gel	N° spots/gel	$\bar{x}$ spots	Índice de correlação	
				Géis comparados	Percentual de correlação (%)
<i>L. amazonensis</i>	G1	362	378	G1 e G2	77.3
	G2	306		G1 e G3	70.3
	G3	467		G2 e G3	77.1
<i>L. braziliensis</i>	G1	203	363	G1 e G2	79.4
	G2	303		G1 e G3	84.0
	G3	583		G2 e G3	75.1
<i>L. infantum</i>	G1	339	428	G1 e G2	84.5
	G2	413		G1 e G3	77.1
	G3	532		G2 e G3	72.4

### 5.3 Western blot

Para a detecção das proteínas reativas na técnica de Tafuri *et al.*, 2004 e avaliação da reprodutibilidade entre as diferentes membranas contendo extratos protéicos de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, os experimentos foram realizados utilizando *strips* de 7 cm com 200 ug de proteína, pH variando de 4 a 7 e SDS-PAGE 12%. As proteínas foram transferidas para as membranas e a reação foi realizada conforme descrito.

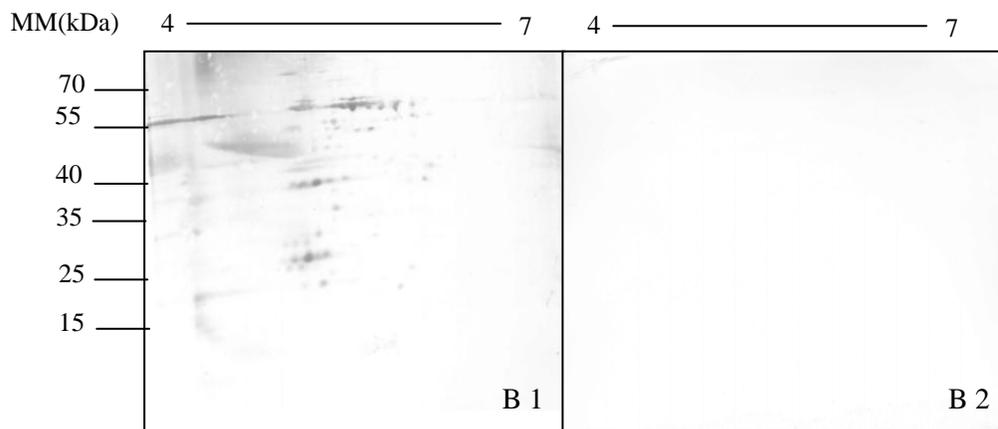
Para exclusão das proteínas reativas de forma inespecífica à técnica de Tafuri *et al.*, 2004 dos extratos protéicos de *L. amazonensis* (figura 4), *L. braziliensis* (figura 5) e *L. infantum* (figura 6) foram realizados experimentos usando *pool* de soros de cães negativos para leishmaniose. As membranas de nitrocelulose reveladas demonstraram a presença de proteínas reativas somente na reação com antígeno de *L. infantum*.

Observou-se um perfil muito semelhante entre os extratos da mesma espécie, indicando alta reprodutibilidade dos experimentos e também um perfil característico para cada espécie. Em *L. amazonensis* os *spots* reativos estavam em uma faixa ampla de MM (massa molecular) principalmente nos valores entre 60 e 20kDa. Observou-se também nessa espécie que o pI dos *spots* reativos se concentrava entre 4,5 a 6,0 (Figura 4).

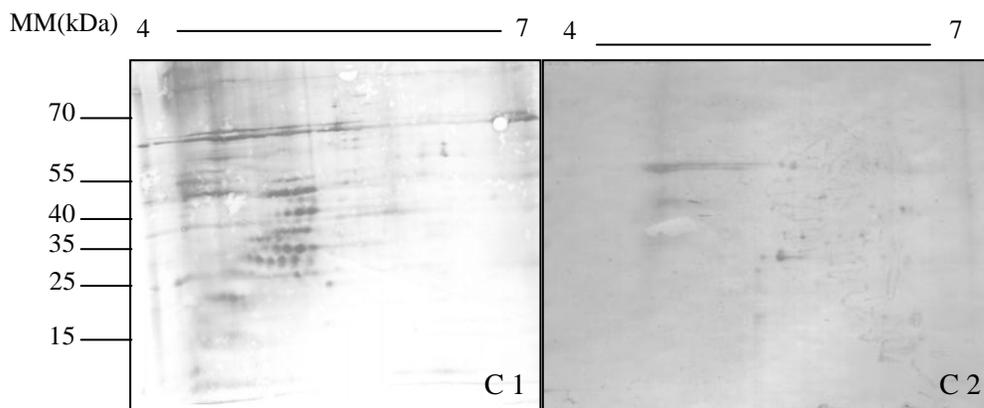


**Figura 4:** Membranas de nitrocelulose mostrando as proteínas de *L. amazonensis* reativas à técnica de Tafuri *et al.*, 2004, em A1 e o controle negativo para a mesma espécie em A2.

Da mesma forma, para os extratos protéicos de *L. braziliensis* (Figura 5) e de *L. infantum* (Figura 6), houve semelhança entre os perfis de amostras independentes da mesma espécie, bem como a distribuição dos *spots* reativos quanto aos valores de MM e de pI foram similares.



**Figura 5:** Membranas de nitrocelulose mostrando as proteínas de *L. braziliensis* reativas à técnica de Tafuri *et al* 2004, em B1 e o controle negativo para a mesma espécie em B2.



**Figura 6:** Membranas de nitrocelulose mostrando as proteínas de *L. infantum* reativas à técnica de Tafuri *et al* 2004, em C1 e o controle negativo para a mesma espécie em C2.

O número médio de *spots* foi de 57, 72 e 78, para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*, respectivamente, representados na tabela 3. Esses números indicam diferenças de percentual quanto ao número de *spots* reativos frente ao soro utilizado. Considerando o número médio de *spots* observados nos géis realizados sob as mesmas condições (7cm, pI 4-7, SDS-PAGE 12%), em *L. amazonensis* cerca de 15% dos *spots* (57/378) foram reativos, em *L. braziliensis* 19,8% (72/363) dos *spots* foram reativos e em *L. infantum* observou-se 18% (78/428) de *spots* reativos. O percentual de correlação das membranas foi calculado considerando a membrana com maior número de *spots* reativos como sendo 100%, e assim foi realizada uma sobreposição das outras

duas membranas de cada uma das espécies estudadas, calculando a similaridade entre elas. Esses dados podem ser observados na tabela 3.

**Tabela 3:** Número de *spots* reativos para *Leishmania amazonensis* (PH8), *L.braziliensis* (2904) e *L. infantum* (BH46), número médio de *spots* reconhecidos e percentual de correlação entre as membranas comparadas para cada espécie.

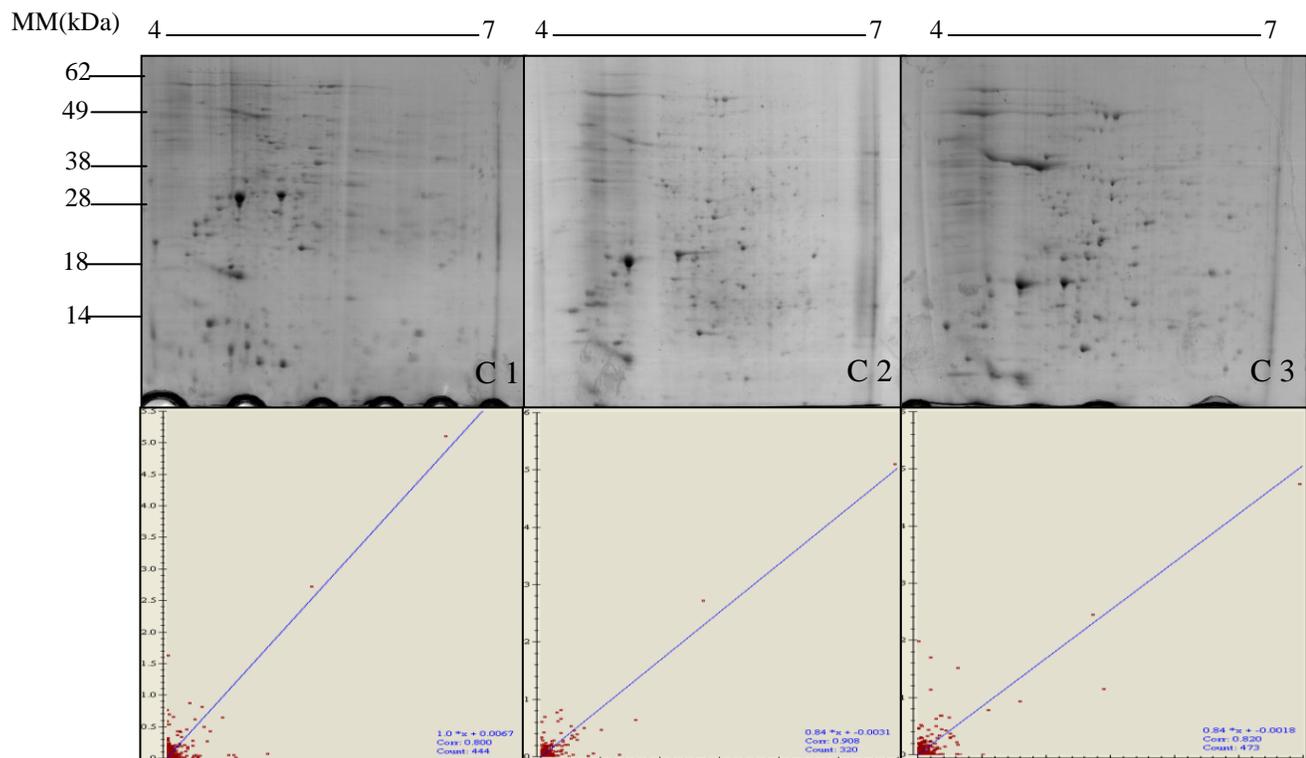
Espécie	Membrana	Nº de <i>spots</i> WB	$\bar{x}$ <i>spots</i>	Percentual de correlação %
<i>L. amazonensis</i>	M1	61	57	100
	M2	59		97
	M3	51		84
<i>L.braziliensis</i>	M1	74	72	100
	M2	71		96
	M3	70		95
<i>L.infantum</i>	M1	85	78	100
	M2	80		94
	M3	71		84

#### 5.4 Seleção e identificação das proteínas antigênicas

Como já referido, os géis de 18 cm apresentam maior resolução e maior quantidade de proteínas. Assim, foram confeccionados géis de 18 cm, 900ug de proteínas, com pH variando de 4 a 7, para melhor separação das proteínas, para cada uma das espécies, bem como para a posterior seleção das proteínas reativas.

O número de *spots* desses géis foi muito maior que o observado para os géis de 7cm, considerando o mesmo extrato protéico. O índice de correlação entre esses géis também foi calculado, conforme descrito para os géis de 7cm. Esses dados podem ser observados nas figuras 7A, 8A e 9A.





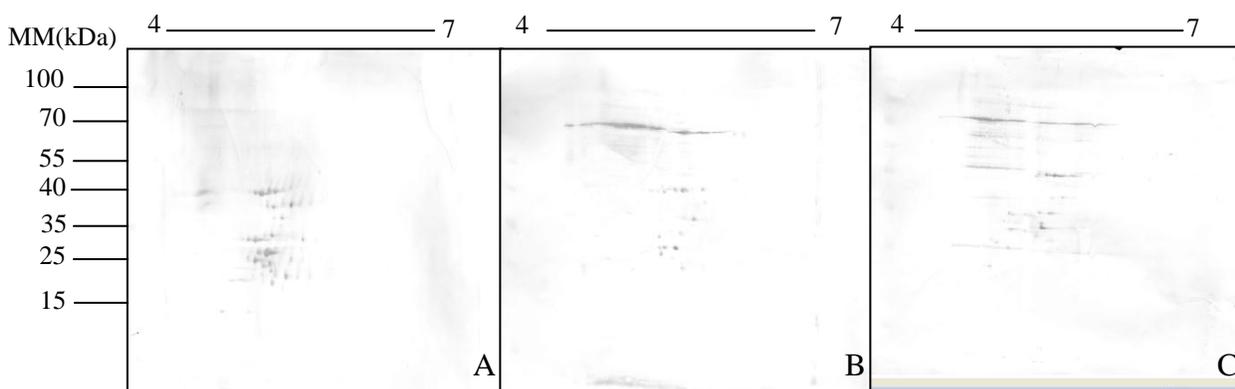
**Figura 9 A:** Géis 2DE de 18 cm, IPG pH 4 a 7, SDS-PAGE 12%, corados por Comassie Brilliant blue G250. C1, C2 e C3 são triplicatas dos extratos de proteínas de cultivos independentes de *L. infantum*. Abaixo, gráficos demonstrando os índices de correlação entre os géis.

O experimento foi dividido em três etapas e foram obtidos três géis de cada uma das espécies. Observou-se que os géis 2-DE dos extratos de *L. amazonensis* apresentaram uma média de 690 spots e índice de correlação entre 77.3% a 81.7%. Para *L. braziliensis* a média de spots visualidos foi de 938 e o índice de correlação entre os géis variou de 70.9% a 93.1% e nos géis de *L. infantum* foram observados uma média de 1486 spots com índice de correlação entre 80.0% a 90.8%. Esses dados estão representados na tabela 4 e nos indicaram, de forma geral, uma maior reprodutibilidade entre os géis de 18 cm, quando comparados aos índices de correlação entre os géis de 7cm.

**Tabela 4:** Número de *spots* obtidos para *Leishmania amazonensis* (PH8), *L.braziliensis* (2904) e *L. infantum* (BH46), número médio de *spots* e percentual de correlação entre os géis comparados para cada espécie.

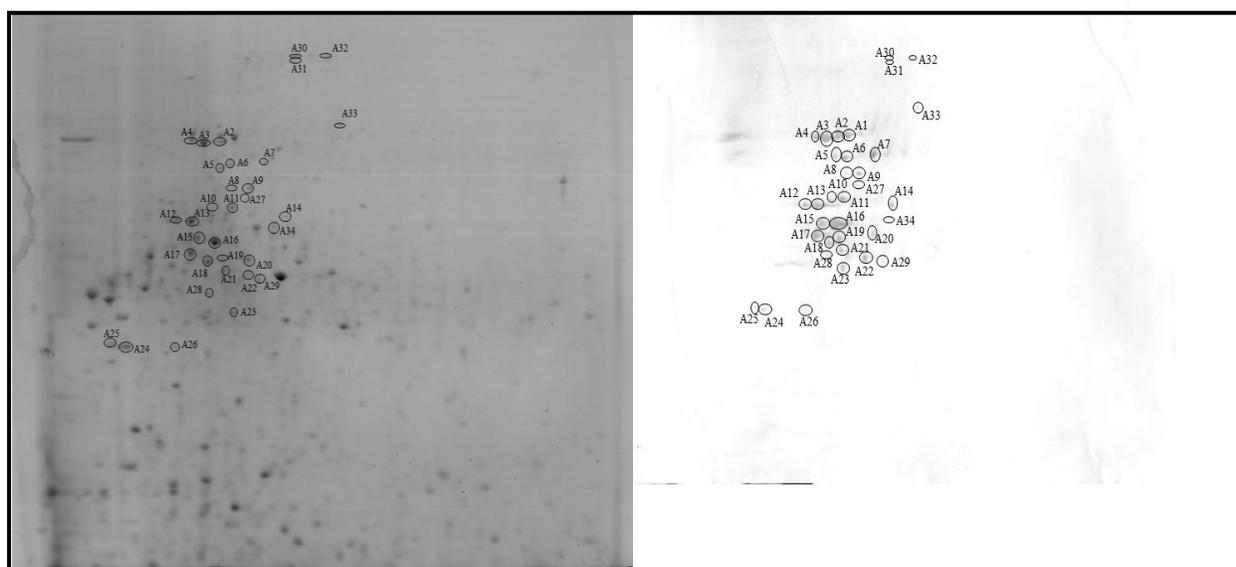
Espécie	Gel	N° spots/gel	$\bar{x}$ spots	Índice de correlação	
				Géis comparados	Percentual de correlação (%)
<i>L. amazonensis</i>	G1	564	690	G1 e G2	77.3
	G2	798		G1 e G3	76.5
	G3	708		G2 e G3	81.7
<i>L.braziliensis</i>	G1	1186	938	G1 e G2	93.1
	G2	910		G1 e G3	70.9
	G3	720		G2 e G3	72.5
<i>L. infantum</i>	G1	1408	1486	G1 e G2	80.0
	G2	1082		G1 e G3	90.8
	G3	1969		G2 e G3	82.0

Para seleção e posterior identificação das proteínas reativas ao teste de Tafuri *et al.*, 2004 foi realizado um experimento utilizando *strips* de 18 cm, 900ug de proteínas, com pH variando de 4 a 7, conforme o teste imuno-histoquímico em membrana de nitrocelulose. Foram obtidas três imagens de membranas, sendo uma de *L. amazonensis* (PH8), uma de *L. braziliensis* (2904) e uma de *L.infantum* (BH46). As membranas de 18 cm apresentaram uma perfil de *spots* reativos semelhante àquele observado nas membrans de 7cm para cada uma das espécies, como podemos observar na figura 10.

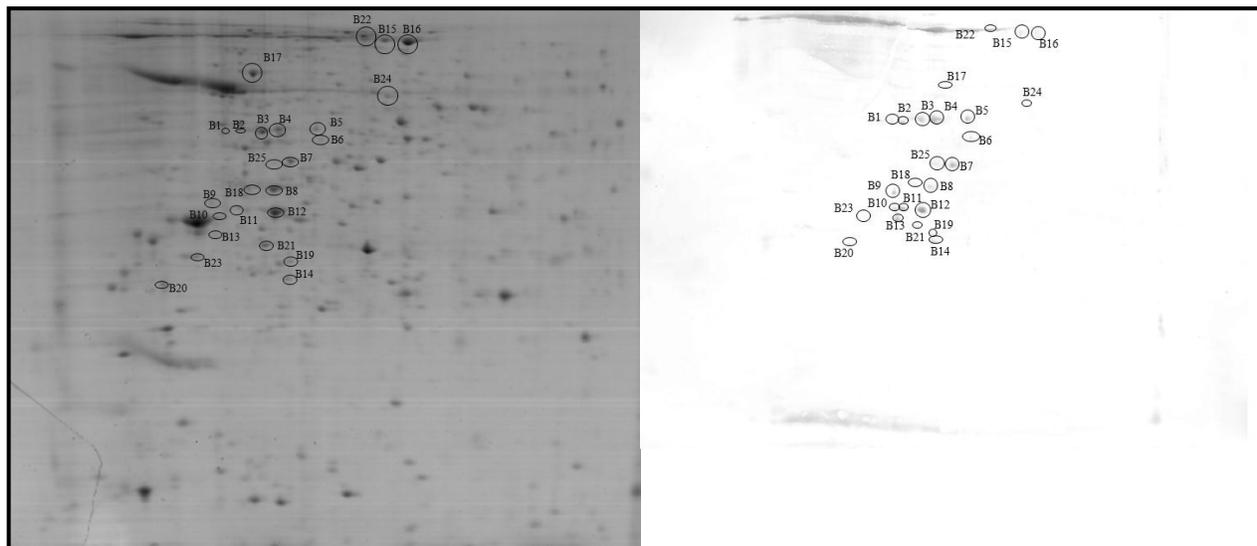


**Figura 10:** Membranas de nitrocelulose de 18cm mostrando as proteínas reativas ao teste de Tafuri *et al.* 2004, para *L. amazonensis* (A), *L. braziliensis* (B) e *L.infantum* (C), respectivamente.

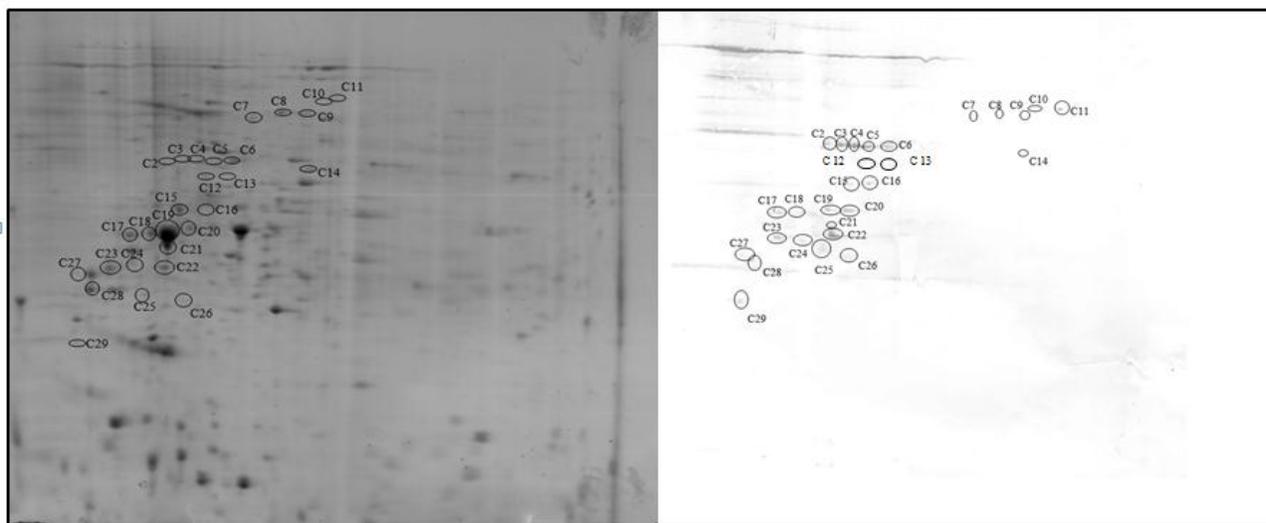
A seleção das proteínas antigênicas foi realizada através da sobreposição entre gel e membrana de 18 cm para cada uma das espécies estudadas, excluindo as reações inespecíficas. Esse processo permitiu que as proteínas reativas no western blot fossem localizadas e retiradas dos géis de *L. amazonensis* (PH8), *L. braziliensis* (2904) e *L. infantum* (BH46). Os *spots* selecionados foram identificados utilizando letras e números. Em *L. amazonensis* os *spots* foram numerados de A1 a A34, figura 11, em *L. braziliensis* de B1 a B25, figura 12, e em *L. infantum* de C2 a C29, figura 13.



**Figura 11:** Representação de um gel e uma membrana de 18cm de *L. amazonensis* e os *spots* selecionados para identificação. Os números dos *spots* são correspondentes no gel, membrana e tabela de A1 a A34.



**Figura 12:** Representação de um gel e uma membrana de 18cm de *L. braziliensis* e os *spots* selecionados para identificação. Os números dos *spots* são correspondentes no gel, membrana e tabela de B1 a B25.



**Figura 13:** Representação de um gel e uma membrana de 18cm de *L. infantum* e os *spots* selecionados para identificação. O número dos *spots* são correspondentes no gel, membrana e tabela de C2 a C29.

Um total de 86 *spots* foram selecionados e retirados dos géis, sendo 33 de *L.amazonensis*, 25 de *L. braziliensis* e 28 de *L.infantum*. Então, esses *spots* passaram por um processo de digestão por tripsina, e os peptídeos trípticos extraídos para cada uma das três espécies estudadas, foram analisados por espectrometria de massa e posteriormente identificados (Anexo). A identificação das proteínas está representada nas tabelas 5, 6 e 7.

**Tabela 5:** Representação dos *spots* selecionados, das correspondentes proteínas identificadas e seus respectivos Gi em *L. amazonensis*.

N° do <i>spot</i>	Proteína	Gi
A2, A3, A4, A11, A12, A13, A16, A17, A18, A21/ A9, A22/ A24/ A29	Proteína de choque térmico 70	3386646/293059/239586186/1552344
A5	subunidade $\beta$ da ATPase	146088806
A7, A10	metalo-peptidase	401428054
A12	PDI 52 kDa	116293933
A13	Proteína regulada por glicose 78	16797868
A15	$\beta$ -tubulina	1296832
A20, A29	$\alpha$ tubulina	606648
A23	S-adenosil-homocisteína hidrolase	146103697
A26	Cadeia epsilon da ATP sintase	401426041
A30/A31	Proteína 1 relacionada a hsp 70, precursor mitocondrial	146093966/146093964

**Tabela 6:** Representação dos *spots* selecionados, das correspondentes proteínas identificadas e seus respectivos Gi em *L. braziliensis*.

N° do <i>spot</i>	Proteína	Gi
B3	Proteína de choque térmico 83	323650339
B4	Proteína de choque térmico 70	1552344
B7	subunidade E1 $\beta$ da piruvato desidrogenase	146089026
B8, B18	$\beta$ -tubulina	154343836
B9, B10	proteína de choque térmico-like protein	154343245
B11, B21/B12, B18	$\alpha$ -tubulina	389600613/606648
B14	subunidade proteolítica do complexo hslvu like, treonina peptidase	154346210
B15, B16	Proteína 1 relacionada a hsp 70, precursor mitocondrial	154341833
B17	subunidade b da ATP sintase vacuolar	154340667
B19/B20	Proteína hipotética conservada	154346772/154334121
B19	subunidade 5 $\alpha$ do proteasoma	154343830
B22	proteína paraflagelar rod 2C	146082920
B23	Proteína 14-3-3 -like protein	154346050
B24	N-acil-L-aminoácido amidohidrolase	389603990

**Tabela 7:** Representação dos *spots* selecionados, das correspondentes proteínas identificadas e seus respectivos Gi em *L. infantum*.

N° do <i>spot</i>	Proteína	Gi
C3/C4/C13	Proteína de choque térmico 70	758136/3386646/1552344
C6	Proteína de choque térmico 83	339898954/154343718
C12/C16/C22/C28	Proteína hipotética conservada	146105064/146081345/146103425/146081233
C13	1,2-Dihidroxi-3-ceto-5-metilpentano dioxigenase	146099894
C17	fator de elongação da transcrição 1- $\beta$	146104117
C17	fator de elongação 1- $\beta$	401428375
C18, C19, C23, C27, C28/ C19, C23, C28, C19/ C20, C21/ C27/ C29	$\beta$ -tubulina	1296832/146078076/91983209/299829504/ 91983209/110816092

Um total de 34 *spots* foi selecionado, 33 foram retirados e 23 foram identificados, em *L. amazonensis* correspondendo a 10 proteínas, em *L. braziliensis*, esses valores foram de 25, 20 e 14, respectivamente e por fim em *L. infantum*, foram selecionados e retirados 28 *spots*, identificados 16, correspondendo a 7 proteínas. Esses dados estão representados na tabela 8.

**Tabela 8:** Representação do número de *spots* selecionados, identificados e das proteínas correspondentes, para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.

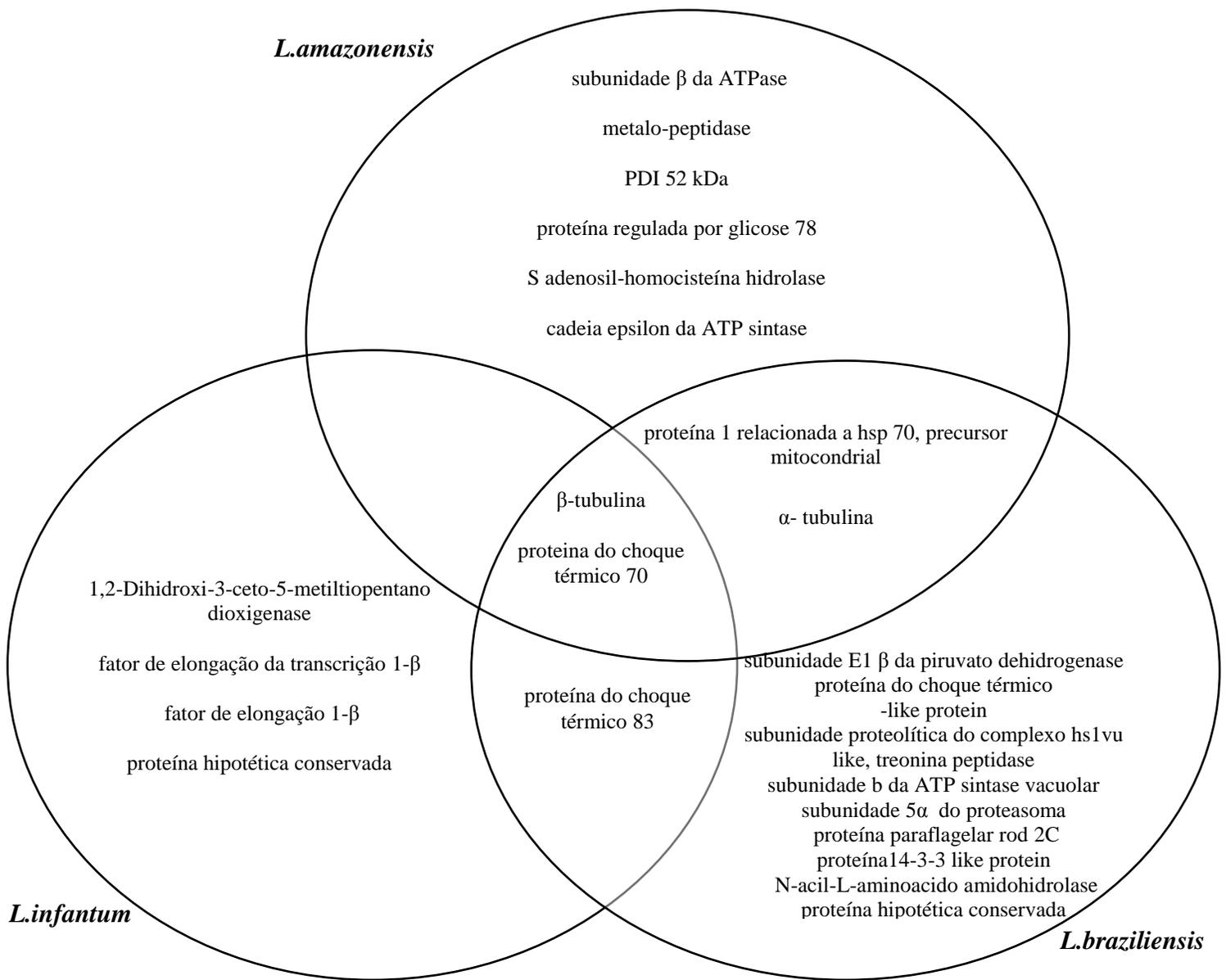
Espécie	N° de <i>spots</i> selecionados/retirados	N° de <i>spots</i> identificados	N° de proteínas
<i>L. amazonensis</i>	33	23	10
<i>L. braziliensis</i>	25	20	14
<i>L. infantum</i>	28	16	7

Dentre as proteínas identificadas algumas foram específicas para cada uma das espécies estudadas, sendo, 6 para *L. amazonensis*, 9 para *L. braziliensis* e 4 para *L. infantum*. A tabela 9 mostra essas proteínas de acordo com a espécie onde foram encontradas, e as identificações correspondentes.

**Tabela 9:** Proteínas antigênicas identificadas exclusivamente em cada uma das espécies estudadas.

Espécie	Spot	Proteína
<i>L. amazonensis</i>	A5	subunidade $\beta$ da ATPase
	A7, A10	metalo-peptidase
	A12	PDI 52 kDa
	A13	proteína regulada por glicose 78
	A23	S-adenosil homocisteína hidrolase
	A26	cadeia epsilon da ATP sintase
<i>L. braziliensis</i>	B7	subunidade E1 $\beta$ da piruvato desidrogenase
	B9/B10	proteína do choque térmico like
	B14	subunidade proteolítica do complexo hs 1 vu like, treonina peptidase
	B17	subunidade b da ATP sintase vacuolar
	B19/B20	proteína conservada hipotética
	B19	subunidade 5 $\alpha$ do proteasoma
	B22	proteína paraflagelar rod 2C
	B23	proteína 14-3-3 proteína like
B24	N-acil-L-aminoácido amidohidrolase	
<i>L. infantum</i>	C12, C16, C22, C28	proteína conservada hipotética
	C13	1,2-Dihidroxi-3-ceto-5-metilpentano dioxigenase
	C17	fator de alongação da transcrição 1- $\beta$
	C17	fator de alongação 1- $\beta$

Algumas das proteínas identificadas puderam ser encontradas em duas, das três espécies estudadas, de forma simultânea, como  $\alpha$ - tubulina e proteína 1 relacionada a HSP 70, precursor mitocondrial, reveladas em *L. amazonensis* e *L. braziliensis*; e HSP 83, compartilhada por *L. braziliensis* e *L. infantum*. Verificou-se ainda a reatividade da  $\beta$  tubulina e HSP 70 nas três espécies estudadas, simultaneamente. Esses dados estão demonstrados no diagrama de Venn, figura 14.



**Figura 14:** Diagrama de Venn representando as proteínas identificadas que são específicas para cada uma das espécies e aquelas que são compartilhadas entre duas, ou todas as espécies.

## 6 Discussão

As leishmanioses são um problema de saúde pública sendo classificadas pela OMS como uma das seis doenças tropicais mais importantes em países em desenvolvimento (WHO, 2013). Assim, estudos que visem aprimorar as medidas de controle, métodos de diagnóstico e tratamento tornam-se necessários. Ambas as formas da doença, tegumentar e visceral (nas suas diversas formas clínicas ou subclínicas), tem relevância devido sua ampla distribuição geográfica e gravidade das manifestações clínicas. Portanto, é global as buscas alternativas de controle, como a vacinação, métodos de diagnóstico mais precisos e de fácil execução gerando resultados mais confiáveis e ágeis para detecção precoce da doença (Desjeux, 2004). Entretanto, os métodos de diagnóstico mais comumente empregados para as diferentes formas da leishmaniose apresentam desafios, seja na precisão dos resultados ou, ainda, na execução dos mesmos. Esses obstáculos afetam diretamente a eficiência do tratamento e o controle da morbidade.

O presente estudo teve como objetivo realizar análise proteômica dos extratos das formas promastigotas das três espécies de *Leishmania* mais presentes no estado de Minas Gerais; *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (Ministério da Saúde 2006, 2007), e identificar as proteínas reativas no teste descrito por Tafuri *et al.*, 2004, de forma específica e compartilhada, que poderão vir a ser usadas em métodos de diagnósticos alternativos. A leishmaniose visceral é a forma clínica com acometimento sistêmico do hospedeiro vertebrado concentrando grande número de parasitos em órgãos ricos em células do SMM como fígado, baço, linfonodos, medula óssea, rins e trato gastrointestinal. A presença de parasitos no baço pode ser uma das causas da intensa ativação policlonal de linfócitos B e consequente aumento da produção de anticorpos que é refletida em aumento da fração de globulina (Amusategui *et al.*, 2003). Entretanto, muitos desses anticorpos podem apresentar reação cruzada com outras espécies de *Leishmania* e com outros parasitos (Da Costa *et al.*, 1991; Cardoso & Cabral, 1998; Carvalho *et al.*, 2003)

Nesse trabalho, utilizando promastigotas de *L. amazonensis* (PH8), *strips* de 18 cm com pH de 4-7, foi detectado uma média de 690 *spots*, em sua maioria, localizada em uma faixa de massa molecular entre 10 e 40kDa. Brobey *et al.*, 2006 objetivaram comparar a expressão de proteínas de promastigotas entre *L. amazonensis* da cepa MHOM/BR/77/LTB0016 e *L. major* da cepa MRHO/SU/59/P/LV39, e

para isso, utilizaram *strips* de 17cm com pI de 3-10. Após a confecção dos géis, de *L. amazonensis* e *L. major*, e coloração por prata, foi possível detectar aproximadamente, 1650 e 1530 *spots*, respectivamente, localizados, em sua maioria entre 20 e 60kDa e pI entre 4-7, para *L. amazonensis*. O número maior de *spots* detectados por Brobey *et al.*, 2006 pode ser explicado devido a faixa de pH, 3-10, método de coloração, e os critérios para a seleção dos *spots* utilizados. A coloração por prata é muito mais sensível que a coloração por Coomassie detectando um número maior de *spots*, e, esses são selecionados para análise, na maioria das vezes, considerando o seu tamanho, podendo esses valores ser mais ou menos rigorosos de acordo com o objetivo do trabalho. Esses vários fatores podem ter interferido no número total de *spots* encontrado em cada trabalho.

Utilizando a mesma metodologia, e sob as mesmas condições, foram confeccionados géis de 18 cm, utilizando extratos de promastigotas de *L. braziliensis* (2904), permitindo a detecção de uma média de 938 *spots*, em sua maioria, localizados numa faixa de massa molecular acima de 20kDa. Cuervo *et al.*, 2007 descreveram a primeira compilação de um mapa de referência proteômica para promastigotas de *L. braziliensis* da cepa MHOM/BR/2001/JOLIVAL, utilizando *strips* de 17 cm, com pI de 4-7 e MM de 10 a 130 kDa. O trabalho objetivou fornecer uma ferramenta para estudos comparativos entre cepas isoladas de pacientes com diferentes manifestações clínicas da leishmaniose, bem como uma potencial ferramenta para a identificação de marcadores úteis para o diagnóstico clínico, terapêutica, prognóstico e candidatos à vacina. No trabalho foram detectados 641 *spots* em géis corados com Coomassie, com a maioria dos *spots*, predominantemente, localizados na faixa de massa molecular acima de 21kDa.

Para *L. infantum* (BH46), a média de *spots* encontrada foi de aproximadamente 1486, considerando as mesmas condições citadas anteriormente. Os *spots* reativos estão localizados, em sua maioria, em uma faixa de massa molecular, entre 20 e 50kDa. Costa *et al.*, 2011 pretenderam identificar proteínas de *L. infantum* que poderiam ser candidatos a vacina e testes diagnósticos mais acurados. Para isso foram utilizados extratos de amastigotas e promastigotas de *L. infantum* da cepa BH400, *strips* de 18 cm e pH de 4 a 7, detectando aproximadamente 900 *spots* nos extratos de cada um dos dois estágios evolutivos do parasito.

Estudos anteriores demonstraram a eficácia da técnica alternativa da imuno-histoquímica desenvolvida por Tafuri *et al.*, em 2004. Inicialmente o teste foi utilizado para diagnóstico da LVC e Xavier *et al.*, 2006 mostraram uma boa correlação positiva entre a PCR e a IHC, não ocorrendo diferença significativa entre as duas técnicas de diagnóstico, utilizando biópsias de pele de diferentes regiões anatômicas (orelha, nariz e abdômen). Queiroz *et al.*, em 2010 afirmaram que a IHQ deve ser usada para confirmação da sorologia, por RIFI e ELISA, e a PCR deverá ser realizada apenas nos casos suspeitos após a imuno-histoquímica. Esses autores mostraram que a eficiência dos testes de diagnóstico em cães suspeitos para leishmaniose visceral variou de acordo com a evolução da doença, demonstrando a necessidade da associação de técnicas, para um diagnóstico mais conclusivo. Em trabalho mais recente, Amorim *et al.*, 2011 confirmaram os dados de Xavier *et al.*, 2006 e ainda, demonstraram que cães sintomáticos com IHQ positiva tem capacidade infectante aos flebotomíneos. Em seguida, Alves 2011 demonstrou que o método utilizado apresentou sensibilidade de 91,78% para confirmação do diagnóstico de LTA, maior facilidade de execução e menor custo quando comparada com as técnicas de PCR e de imuno-histoquímica, empregando anticorpo monoclonal disponível no mercado.

O teste imuno-histoquímico de Tafuri *et al.*, 2004 é realizado em tecido, detectando, portanto, formas amastigotas do parasito. Entretanto, a realização do presente trabalho, utilizando essa forma evolutiva tornaria o mesmo mais laborioso. Dessa forma, buscamos uma maneira alternativa e eficiente de realizá-lo. Fakhry *et al.*, 2002, Bente *et al.*, 2003, Nugent *et al.*, 2004, McNicoll *et al.*, 2006, Walker *et al.*, 2006 e Costa *et al.*, 2011 demonstraram em seus estudos que a similaridade proteômica entre as formas amastigota e promastigota de *Leishmania* é maior que 90%, assim, optamos por utilizar as formas promastigotas.

A utilização de imunoproteômica para identificação de novos antígenos tem sido amplamente utilizada. Estudos proteômicos com *Leishmania* spp demonstraram a diferença de expressão proteica entre as formas amastigotas e promastigotas e a possibilidade de utilização da “sorologia proteômica” como uma abordagem adequada para mapeamento da antigenicidade na leishmaniose (Costa *et al.*, 2011). Recentemente, um estudo utilizando eletroforese em gel bidimensional (2-DE) de extrato de promastigotas de *L. infantum*, seguido de “Western Blot” com soro de coelhos imunizados e análise por espectrometria de massa (EM), permitiu a

identificação de várias proteínas antigênicas relevantes (Dea-Ayuela *et al.*, 2006). Em uma abordagem semelhante foram identificados vários antígenos de *L. donovani* utilizando soros e parasitos isolados de pacientes indianos, permitindo concluir que a abordagem proteoma-sorologia produz uma compreensiva e altamente resolvida representação da antigenicidade de *L. donovani* e da especificidade da resposta imune anti-*Leishmania* em pacientes com leishmaniose visceral (Forgber *et al.*, 2006). Costa *et al* em 2011 realizaram experimentos de western blot a partir de gel 2DE para identificação de proteínas reativas a anticorpos caninos anti-*Leishmania infantum*. O trabalho objetivou identificar e caracterizar novos antígenos que pudessem ser utilizados no desenvolvimento de uma vacina ou/e métodos de diagnósticos alternativos.

Os soros de cães negativos para leishmaniose utilizados nesse trabalho, provenientes de área não endêmica para doença, utilizados como controle das reações inespecíficas, reagiram apenas quando em contato com antígenos de *L. infantum*. Esse tipo de reação foi demonstrada por Silva *et al.*, 2005 que objetivaram aprofundar o conhecimento sobre o papel do cão como reservatório da leishmaniose visceral. Utilizando as técnicas de RIFI e WB os autores tentaram correlacionar o estado clínico e infectividade para o vetor, com os títulos sorológicos obtidos na RIFI e frações antigênicas reveladas no WB; para tentar identificar também em uma população canina, os indivíduos que estão atuando como fonte de infecção. Os resultados obtidos mostraram que as frações antigênicas de 23,5, 25, 29, 32, 42,5kDa de promastigotas de *L. infantum* (cepa L-579) foram fortemente reconhecidas no WB, pelos soros de cães positivos pela RIFI. Por outro lado, não foi possível observar diferença no perfil de reconhecimento antigênico de cães soronegativos de área endêmica e de área não endêmica, que reconheceram fracamente frações peptídicas de 37, 42,5 e 71,5kDa da mesma espécie.

A não reatividade de antígenos de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* frente aos soros de cães não infectados pode ser explicada pela diferença de expressão de proteínas em cada uma das espécies; levando a reação dos anticorpos com as proteínas altamente expressas, em *L. infantum*, e a não reatividade com as espécies causadoras de LTA pela sua menor expressão. Isso explicaria também a reatividade exclusiva de antígenos de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* frente ao soro de cão infectado com *L. infantum*. Requena *et al.*, 2000 sugeriram que anticorpos anti-

*Leishmania* são direcionados primeiramente contra antígenos conservados e altamente expressos, como proteínas do choque térmico, proteínas ribossomais e proteínas associadas a maquinaria de replicação e transcrição do DNA.

No presente estudo 24 proteínas foram identificadas, sendo 19 reativas de forma específica e cinco compartilhadas. As proteínas  $\beta$  tubulina e a proteína de choque térmico 70 (HSP70) foram reativas simultaneamente, para as três espécies estudadas. Todavia, esse resultado não foi surpreendente uma vez que essas proteínas já tinham sido identificadas por outros autores como imunogênicas (Probst *et al.*, 2001; Carmelo *et al.*, 2006) e/ou testadas para uso em diagnóstico de LV (Rasouli *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011). A tubulina é membro da família das proteínas globulares, e é formada por subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , que compõem os microtúbulos. Cada uma delas tem um peso molecular de aproximadamente 55 kDa. Probst *et al.*, 2001, considerando que a imunidade contra infecções por *Leishmania* é mediada por células TCD4<sup>+</sup>, do fenótipo Th1, objetivaram demonstrar a expressão de alguns antígenos de *Leishmania*, usando linhagens clonais de células T derivadas de um doador imune. Foi demonstrado, para a  $\beta$  tubulina, um dos antígenos identificados, que células T clonais específicas contra essa proteína responderam à macrófagos e células dendríticas infectados por *Leishmania*, demonstrando o seu potencial como candidata à vacina para leishmaniose.

As HSPs, proteínas de choque térmico, são caracterizadas por serem altamente conservadas na escala evolutiva (Zilberstein e Shapira, 1994; Salotra *et al.*, 1995). Oliveira *et al.*, 2011, objetivando expandir o número de proteínas recombinantes disponíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina e humana, selecionaram antígenos recombinantes de *L. infantum*, por meio de *pools* de soros caninos e humanos infectados. Utilizando a HSP 70, a média da reatividade dos soros de pacientes com leishmaniose visceral foram moderadas, e para os soros de cães infectados com *L. infantum* essa mostrou-se intensa. Em contraste, a reatividade média, em soros de indivíduos saudáveis, pacientes com leishmaniose cutânea e pacientes chagásicos, foi fraca para o mesmo antígeno testado. Situação semelhante foi observada para amostras de cães saudáveis ou com outras doenças infecciosas.

Rasouli *et al.*, em 2009 objetivaram clonar e expressar HSP70 de *L. infantum* e avaliar a resposta de anticorpos contra a proteína, na leishmaniose visceral. Os resultados de ELISA mostraram que

81,1% (30/37) dos soros dos pacientes e de 6,3% (5/63) dos soros controles reagiram para HSP70 *L.infantum*. Trata-se de uma molécula conservada, sendo essa, uma vantagem para os estudos de vacinas, podendo ser usada também como uma ferramenta para o diagnóstico sorológico.

Alguns estudos vêm mostrando a forte reação entre os anticorpos de soros de indivíduos com leishmanioses e proteínas conservadas do parasita, como as proteínas ribossomais, as histonas e as proteínas de choque térmico. Algumas dessas proteínas são caracterizadas como imunógenos em doenças autoimunes, e a detecção de anticorpos contra elas, considerada indicativo de alteração no sistema imunológico. No estudo de Carmelo *et al.*, 2006 foi investigada uma possível relação entre o reconhecimento de proteínas conservadas de *Leishmania braziliensis* em indivíduos que sofrem da forma cutânea (LC) e mucocutânea (LMC) da leishmaniose tegumentar, e o reconhecimento dos homólogos humanos em pacientes com doença auto imune. Os resultados mostram que a resposta imune gerada durante LC e LMC é induzida especificamente por histona H1 e HSP70 do parasita, uma vez que os soros dos pacientes com LC e LMC não reagiram contra os seus homólogos humanos. Além disso, o reconhecimento específico das proteínas humanas pelos soros autoimunes mostrou fraca reação com as regiões mais divergentes das proteínas parasitárias.

As reações cruzadas em testes de diagnóstico são causadas por determinantes antigênicos comuns, dificultando a precisão do resultado. Assim, Zurita *et al.*, 2003 investigaram a utilização da proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp70) de *L. braziliensis* para diagnóstico sorológico diferencial, em relação ao *Trypanossoma cruzi*. Os dados mostram que a antigenicidade de HSP70 do parasito é altamente reconhecida (84%) por soros de pacientes com LC e LMC, e em menor grau pelos chagásicos (18,75%). Os determinantes antigênicos lineares que apresentam reações cruzadas com os soros chagásicos estão localizados no fragmento rLb70 (352-518). Entretanto, o fragmento rLb70 (513-663) apresenta sensibilidade de 70% e especificidade de 100%, podendo ser considerado um candidato potencial para diagnóstico sorológico específico de LC e LMC causada por *L. braziliensis*.

Outras proteínas, como Hsp 83 e  $\alpha$ -tubulina foram compartilhadas por duas, das tres espécies estudadas, sendo a primeira por *L. braziliensis* e *L. infantum* e a segunda, por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

Rico *et al.*, 2002 demonstraram que as proteínas de choque térmico (HSPs), HSP70 e HSP83, de *Leishmania infantum*, expressadas como proteínas recombinantes, são mitógenos para esplenócitos de murinos. Verificou-se que a incubação *in vitro* de células do baço com Hsps de *Leishmania* levou à expansão de populações de CD220, sugerindo um efeito direto destas proteínas em linfócitos B.

Celeste *et al.*, 2004 analisaram o uso de HSP 83 recombinante de *Leishmania infantum* em ELISA para o diagnóstico sorológico de LC (n= 12) e LMC (n = 14) e observaram a presença de anticorpos anti-HSP83 de *L. infantum* em todas as amostras, assim como anticorpos anti- *Leishmania*. Quando foi testada a reatividade cruzada, os pacientes chagásicos (n = 10) não reagiram. Assim, HSP83 de *L. infantum* foi considerada um bom antígeno para diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar.

Por fim, algumas proteínas foram reveladas de forma específica pra cada uma das três espécies estudadas. Dentre elas, podemos destacar: proteína regulada por glicose 78 (GRP78) revelada em *L. amazonensis*.

O estudo de Jensen *et al.*, 2002 é uma extensão do trabalho anterior de Jensen *et al.*, 2001, e visa avaliar as propriedades imunogênicas da GRP 78 recombinante em relação as células T e B em humano. Os dados do ELISA indicam que a rGRP78 é igualmente eficaz no diagnóstico sorológico da LV (89%), PKDL(78%) e LC (85%). Para avaliar a capacidade de GRP78 recombinante induzir resposta de células T, a proliferação foi medida em amostras de PBMC. Culturas de PBMC, de indivíduos previamente infectados com *L. donovani* ou *L. major*, proliferaram na presença da proteína testada. Os dados encontrados nesse estudo sugerem que GRP78 atua como um imunógeno de células B e de células T durante infecção com *L. donovani* ou *L. major*.

Em suma, foram identificados, nesse trabalho 24 proteínas. Destas quatro já foram avaliadas em estudos anteriores, em relação a antigenicidade, utilização em teste diagnósticos ou até mesmo como candidatas à vacinas (Jensen *et al.*, 2001; Probst *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2002; Rico *et al.*, 2002; Zurita *et al.*, 2003; Celeste *et al.*, 2004; Carmelo *et al.*, 2006; Rasouli *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011) em *Leishmania*. Para as outras não foram encontrados estudos com relação a utilização das mesmas, como alvos de resposta humoral e/ou celular, nessa parasitose.

O presente trabalho permitiu compreender a importância da análise proteômica na identificação de proteínas imunogênicas nas três espécies de *Leishmania* mais amplamente distribuídas no estado de Minas Gerais, utilizando uma técnica alternativa de imuno-histoquímica. Assim, pesquisas futuras empregando algumas dessas moléculas poderiam ser realizadas na tentativa de buscar testes de diagnósticos mais precisos e até mesmo a sua utilização como antígenos vacinais.

## 7 Conclusão

- Foram determinados os perfis proteômicos de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* utilizando gel bidimensional.
- Foram identificadas proteínas reativas ao teste de Tafuri *et al.*, 2004 para as espécies estudadas.
- Observou-se, que das proteínas identificadas, hsp 70 e  $\beta$  tubulina foram reativas, simultaneamente, em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*.
- Entre *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram identificadas a proteína 1 relacionada a hsp 70, precursor mitocondrial e  $\alpha$ - tubulina, simultaneamente.
- Hsp 83 foi reativa, simultaneamente, em *L. braziliensis* e *L. infantum*.
- E por fim, em *L. amazonensis* seis proteínas foram reativas especificamente, enquanto para *L. braziliensis* foram nove, e em *L. infantum* quatro proteínas foram identificadas.

## 8 Referências Bibliográficas

- Ahluwalia S, Lawn SD, Kanagalingam J, Grant H, Lockwood DNJ 2004. Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travelers to central and South America. *BMJ*.329:842-4.
- Alvar J, Gutiérrez-Solar B, Pachón I, Calbacho E, Ramírez M, Vallés R, Guillén JL, Cañavate C, Amela C 1996. AIDS and *Leishmania infantum*: new approaches for a new epidemiological problem. *Clin. Dermatol*.14:241–246.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 298-319.
- Alves CF 2011. Leishmaniose Tegumentar Americana Humana: Eficácia de Novo Método Imuno-histoquímico na Identificação de Formas Amastigotas de *Leishmania* sp. em Lesões de Pele. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Amorim IFG, Silva SM, Figueiredo MM, Moura EP, Castro RS, Lima TKS, Gontijo NF, Michalick MSM, Gollob KJ, Tafuri WL 2011. Toll Receptors Type-2 and CR3 Expression of Canine Monocytes and Its Correlation with Immunohistochemistry and Xenodiagnosis in Visceral Leishmaniasis. *Plos One*. 6: 1-10.
- Amusatogui I, Sainz A, Rodriguez F, Tesouro M 2003. A distribution and relationship between clinical and biopathological parameters in canine Leishmaniasis. *Eur. J. Epidemiol.* 18: 147-156.
- Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30: 1269-1281.
- Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AMP, Siqueira IC, Costa CHN, Costa DL, Holanda TA, Soares VYR, Biá M, Caldas AJM, Romero GAS, Rabello A 2008. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol Serv Saúde, Brasília*. 17(2):107-116.
- Avila HÁ, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, De Grave W, Bente CMM, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause Clos J, Bruchhaus I. 2003. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 3(9): 1811-29.
- Barbosa AJA 1988. As técnicas de Imunoperoxidase no Estudo da Etiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 21:1-6.
- Basano SA, Camargo LMA 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. Bras. Epidemiol.*7:328-337.

- Basset D, Faraut F, Marty P, Dereure J, Rosenthal E, Mary C, Pratlong F, Lachaud L, Bastien P, Dedet JP 2005. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 newcases and a review of the literature. *Microbes Infect.* 7(13):1370-5.
- Bates P 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology.* 37:1097–1106.
- Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, Clos J, Bruchhaus I 2003. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 3:1811–1829.
- Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB 2000. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 63:153-157.
- Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP 1997. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:439–440.
- Britto C, Pirmez C, Fernandes O 2005. Técnicas básicas de diagnóstico molecular em doenças infecciosas e parasitárias. In: Coura JR editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 195-23
- Brobey RKB, Mei FC, Cheng X, Soong L 2006. Comparative Two-Dimensional Gel Electrophoresis Maps for Promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 10(1):1-6.
- Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG 1993. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(2):775-9.
- Cabrera MAA, Paula AA, Camacho LAB, Marzochi MCA, Xavier SC, Silva AVM, Jansen AM 2003. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 45(2):79-83.
- Cardoso L, Cabral M 1998. *Leishmania* and canine Leishmaniasis. *Ver. Port. Ciênc. Vet.* 527:122-141.
- Carmelo E, Zurita AI, Martinez E, Valladares B 2006. The sera from individuals suffering from cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* present antibodies against parasitic conserved proteins, but not their human counterparts. *J. Parasitol.* 89(2):372-8.
- Carvalho EM, Correa-Filho D, Barcelar O, Almeida, RP, Less H, Rocha H 1995. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 53: 273-277.

- Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R 2003. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68(3):321-4.
- Celeste BJ, Angel SO, Castro LG, Gidlund M, Goto H 2004. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37(11):1591-3.
- Convit J, Ulrich M, Fernandez CT 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87:444-8.
- Costa MM, Andrade HM, Bartholomeu DC, Freitas LM, Pires SF, Chapeaurouge AD, Perales J, Ferreira AT, Giusta MS, Melo MN, Gazzinelli RT 2011. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: Identification of Novel Candidate Antigens for Diagnostic Tests and Vaccine. *Proteome Res.* 10: 2172-2184.
- Cuba CC, Netto EM, Costa JLM, Barreto AC, Marsden PD 1986. El cultivo "in vitro" como instrumento practico para el diagnostico y aislamiento primario de *Leishmania braziliensis braziliensis*. 2 estudios en pacientes de areas endemicas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 28: 317-24.
- Cuba CC, Netto EM, Marsden PD, Rosa AC, Llanos Cuentas EA, Costa JLM 1986. Cultivation of *Leishmania braziliensis braziliensis* from skin ulcers in man under field conditions. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 456-7.
- Cuervo P, de Jesus JB, Junqueira M, Mendonça-Lima L, González LJ, Betancourt L, Grimaldi G Jr, Domont GB, Fernandes O, Cupolillo E 2007. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 154(1):6-21
- Cupolillo E 2005. Avanços dos estudos moleculares de *Leishmania (Leishmania) chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. Consulta de expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral em las Américas. Informe final. Brasília, Brasil. [acessado em 04 de janeiro de 2013] [http://www.panaftosa.org.br/Comp/Zoonoses/Leishma/doc/Inf\\_final\\_leish\\_005.pdf](http://www.panaftosa.org.br/Comp/Zoonoses/Leishma/doc/Inf_final_leish_005.pdf).
- Da Costa CA, Genaro O, De Lana M, Magalhães PA, Dias M, Michalick MS, Melo MN, Da Costa RT, Magalhães-Rocha NM, Mayrink W 1991. Canine Visceral Leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 24(1):21-25.
- Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP 2006. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting the paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48 (3): 151-156.

- David JR, Stamm LM, Bezerra HS, Souza RN, Killick-Kendrick R, Lima JW 2001. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96:839-847.
- Dea-Ayuela MA, Rama-Iñiguez S, Bolás-Fernández F. 2006. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. 6: 4187-4194.
- Desjeux P 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin. Dermatol. 14: 417–423.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 27: 305–318.
- Dey A, Singh S 2006. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. Indian J Med Microbiol. 24(3):165-70.
- Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R 1997. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. Clin Infect Dis, 25:1240-1242.
- El Fakhry YE, Ouellette M, Papadopoulou B 2002. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. Proteomics 2: 1007–1017.
- Ferrer L, Rabanal RM, Domingo M, Ramos JA, Fondevila D 1988. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. Res. Vet. Sci.4:194-6.
- Forgber M, Basu R, Roychoudhury K, Theinert S, Roy S, Sundar S, Walden P 2006. Mapping the Antigenicity of the Parasites in *Leishmania donovani* Infection by Proteome Serology. PLoS one. 1:1-11.
- Garg R, Dube A 2006. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. The Indian Journal of Medical Research. 123 (3):439-454.
- Ghosh Dastidar B, Neogy A, Nandy A 1983. Serologic studies in kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis. In: Proceedings of the Indo-UK workshop of leishmaniasis. New Delhi: Indian Council of Medical Research.138:43.
- Gongora R, Acestor N, Quadroni M, Fasel N, Saraiva NG, Walker J. 2003. Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. Biomedica, 23(2): 153-60.
- Gontijo B, Carvalho M 2003. Leishmaniose tegumentar Americana. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.36(1):71-80.
- Gontijo CMF, Melo MN 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. bras. epidemiol. 7(3): 338-349.

- Gradoni L, Gramiccia M 2008. Leishmaniosis. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), Office International des Epizooties, Paris. 1: 240–250.
- Gramiccia M 2011. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology* 181: 23–30.
- Grevelink SA, Lerner EA 1996. Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 34:257–72.
- Grimaldi G Jr, Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto Id, de-Azevedo CT, Falqueto A 2012. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106(1):54-9.
- Guerra JA, Ribeiro JA, Coelho LI, Barbosa MG, Paes MG 2006. Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in São João, Manaus, Amazonas, Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 22(11):2319-2327.
- Haldar JP, Ghose S, Saha KC, Ghose AC 1983. Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis. *Infect. Immun.* 42:702-7.
- Harith A, Salappendel RJ, Reiter I, Knapen F, Korte P, Huigen E, Kolk RHG 1989. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2252–2257.
- Haseloff RF, Krause E, Blasig IE 2003. Proteomics of brain endothelium. Separation of proteins by two-dimensional gel electrophoresis and identification by mass spectrometry. *Methods Mol. Med.* 89:465-77
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG 2003. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology.* 113: 99-113.
- Jensen AT, Curtis J, Montgomery J, Handman E, Theander TG 2001. Molecular and Immunological characterisation of the Glucose Regulated Protein 78 of *Leishmania donovani*. *Biochim Biophys Acta* 1549: 73–87.
- Jensen ATR, Ismail A, Gaafar A, El Hassan AM, Theander TG 2002. Humoral and cellular immune responses to glucose regulated protein 78 – a novel *Leishmania donovani* antigen. *Tropical Medicine and International Health.* 7: 471–476.
- Kafetzis DA, Maltezou HC 2002. Visceral leishmaniasis in paediatrics. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15(3):289-94.
- Kenner JR, Aronson NE, Bratthauer GL, Turnicky RP, Jackson JE, Tang DB, Sal P 1999. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. *J. Cutan. Pathol.* 26(3):130-136.

- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters Killick-Kendrick, ed.-The leishmaniasis in biology and Medicine. London Academic Press.1:1-120.
- Lainson R 1989. Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis. In: Demography and Vector-Borne Diseases (MW Servicee, ed.). 85-106, Boca Raton: CRC Press.
- Lainson R, Shaw JJ 2010. New World Leishmaniasis. Publicado Online: Mar 15. Disponível em: <http://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470688618.taw0182>
- Lawn SD, Whetham J, Chodini PL, Kanagalingam J, Watson J, Behrens RH, Lockwood DNJ 2004. New world mucosal and cutaneous leishmaniasis: an emerging health problem among British travellers. QJM. 97:781-8.
- Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuvre JP, Lelièvre A, Marty P, Suffia I, Rousseau D, Kubar J 1999. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France, J. Clin. Microbiol. 37: 1953–1957.
- Livni N, Abranowitz A, Londner M, Okon E, Morag A 1983. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. Virchows Arch A. Pathol. Anat. Histopathol. 401(2):147-51.
- Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A 1995. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. Vet. Parasitol. 59: 13–21.
- Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I 2003. Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in clinical samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. J. Clin Microbiol. 41(7):3147-3153.
- Marzochi MCA 1992. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. Jornal Brasileiro de Medicina. 63: 82-104.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF 1994. Leishmanioses tegumentar e visceral no Brasil - Antropozoonoses emergentes e perspectivas de controle. Cad. Saúde Pública. 10 (2): 359-75.
- Matlashewski G 2001. *Leishmania* infection and virulence. Medical Microbiology and Immunology. Vol: 190: 37- 42.
- McNicoll F, Drummel-Smith J, Müller M, Madore E, Boilard N, Ouellette M, Papadopoulou B 2006. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. Proteomics. 6: 3567–3581.

- Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA 1999. Histological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Clin. Dermatol. 17:297-304.
- Melo MN, Mayrink W, Costa CA, Magalhães PA, Williams P, Araújo FG, Coelho MV, Batista SM 1977. Padronização do antígeno de Montenegro. Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo. 19:161-164.
- Ministério da Saúde 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, Ministério da Saúde.
- Ministério da Saúde 2007. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília, Ministério da Saúde.
- Mohebali M, Taran M, Zarei Z 2004. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. Veterinary Parasitology. 121: 239–245.
- Montenegro J 1926. Cutaneous reactions in leishmaniasis. Arc. Dermatol. Syph. 13:187.
- Moreira ED Jr, Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Pontes de Carvalho L 2004. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. Vet. Parasitol. 122:245-252.
- Murray HW 2000. Treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar): a decade of progress and future approaches. Int J Infect Dis. 4:158-77.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. Lancet. 366 (9496):1561-77.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis. 9(6):255-62.
- Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero J, Smith DF 2004. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. Molecular & Biochemical Parasitology. 136:51–62.
- Nunes CM, Lima VM, Paula HB, Perri SH, Andrade AM, Dias FE, Burattini MN 2008. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. Vet. Parasitol. 153:19-23.
- Oliveira GGS, Magalhães FB, Teixeira MCA, Pereira AM, Pinheiro CGM, Santos LR, Nascimento MB, Bedor CNG, Albuquerque AL, Santos WLC, Gomes YM, Moreira Jr ED, Brito MEF, Pontes de Carvalho LC, Neto OPM 2011. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with

- distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85(6): 1025–1034
- Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, Mencke N, Galli G, Capelli G, Stanneck D 2007. Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennel dogs in an endemic area. *Vet. Parasitol.* 144:270-278.
- Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine.* 2008 Mar 25;26(14):1709-24.
- Pavli A, Maltezou HC 2010. Leishmaniasis: an emerging infection in travelers. *Int. J of Infect Dis.* 14:1032-1039.
- Pessôa SM 1982. *Parasitologia Médica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Peters N, Sacks D 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunological Reviews.* 213: 159–179.
- Probst P, Stromberg E, Ghalib HW, Mozel M, Badaro R, Reed SG, Webb JR 2001. Identification and Characterization of T Cell-Stimulating Antigens from *Leishmania* by CD4 T Cell Expression Cloning. *J Immuno.* 166:498-505.
- Queiroz NMGP, Assis J, Oliveira TMFS, Machado RZ, Nunes CM, Starke-Buzetti WA 2010. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imuno-histoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com teste de RIFI e ELISA. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Jaboticabal.* 19(1):32-38.
- Quintella LP, Cuzzi T, Madeira MF, Okamoto T, Schubach AO 2009. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania(L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 51(2):83-86.
- Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K 2008. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20:393-413.
- Rasouli M, Zavarani Hoseini A, Kazemi B, Alborzi A, Kiany S 2009. Expression of recombinant heat-shock protein 70 of MCAN/IR/96/LON-49, a tool for diagnosis and future vaccine research. *Iran. J. Immunol.* 6 (2):75-86.
- Reithinger R, Davies CR 1999. Is the domestic dog (*Canis Familiaris*) a reservoir host of american Cutaneous Leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(4): 530–541.

- Reithinger R, Quinnel RJ, Alexander B, Davies CR 2002. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic test. Enzyme Immunosorbent-assay, PCR J. Clin. Microbiol. 40: 2352–2356.
- Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, Davies CR 2004. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? Int. J. Parasitol. 34:55-62.
- Reithinger R, Dujardin JC 2007. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. Journal of Clinical Microbiology. 45(1):21–25.
- Requena JM, Alonso C, Soto M 2000. Evolutionarily Conserved Proteins as Prominent Immunogens during *Leishmania* Infections. Parasitology Today. 16: 246-250.
- Rico AI, Girones N, Fresno M, Alonso C, Requena JM 2002. The heat shock proteins, Hsp70 and Hsp83, of *Leishmania infantum* are mitogens for mouse B cells. Cell Stress & Chaperones. (4): 339–346
- Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipnetich S, O’Keeffe C, Davidson RN 2006. Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 74:76-80.
- Rocha RM, Miller K, Soares F, Vassalo J, Schenka N, Gobbi H 2009. The use of the immunohistochemical biotin-free visualization systems for estrogen receptor evaluation of breast cancer. Applied Cancer Research. 29(3):112-117.
- Ross R 1903. Note on the bodies recently described by Leishman e Donovan and further notes on Leishman’s bodies. Brit. Med. J. 2:1261-1401.
- Sacks D, Noben-Trauth N 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat. Rev. Immunol. 2 (11):845-58.
- Salinas G, Valderrama L, Palma G, Montes G, Saravia NG 1989. Detección de amastigotes em leishmaniasis cutânea y mucocutanea por el método de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidade comparadas com métodos convencionales de diagnóstico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 84:53-60.
- Salotra P, Chauhan D, Ralhan R, Bhatnagar R 1995. Tumor necrosis factor-alpha induces preferential expression of stress proteins in virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. Immunology Lett. 44:1-5.
- Sampaio RNR, Andrade GB, Pereira AC, Silva EA, Cuba CA 2002. Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana An bras Dermatol, Rio de Janeiro, 77(5):557-561.

- Saul J, Semiao S, 1996. Canine visceral leishmaniasis in Evora district. In: Protogal: A Seroepidemiological Study. ACP/Academic Press, Amsterdam. 9–74.
- Schraner C, Hasse B, Hasse U, Baumann D, Faeh A, Gunther B, Grimm F, Mathis A, Weber R, Gunthard HF 2005. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. *Clin. Infect. Dis.*40:120-4.
- Sherlock IA, Miranda JC, Sadigursky M, Grimaldi Jr G 1984. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (Marsupialia Didelphidae) with *Leishmania donovani* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 79 (4) 511.
- Sherlock IA 1996. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in Bahia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 91:671-683.
- Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA 1988. Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82(1):66-8.
- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Brazil RP 2004. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and Molecular Research* 2:251-257.
- Silva AVM, Paula AA, Cabrera MAA, Carreira JCA 2005. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 21(1):324-328.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 99(3): 239-251.
- Singh S, Sivakumar R 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J. Postgrad. Med.* 49(1):55-60.
- Singh S 2006. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123(3):311-30.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C 1996. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. *Clin. Diagn, Lab. Immunol.* 3(4):387-91.
- Souza WJ, Sabroza PC, Santos CS, De Sousa E, Henrique MF, Coutinho SG 1992. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Trop.*52:111-119.
- Sundar S, Reed SG, Singh R, Kumar PC, Murray HW 1998. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet.* 351:563-565.

- Sundar S, Rai M 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9(5):951-8.
- Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, De Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL 2004. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. J. Immunol. Methods. 292(1-2):17-23.
- Thiel M, Bruchhaus I. 2001. Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes. Med Microbiol Immunol (Berl). 190 (1-2): 33-6.
- Tolezano JE, Macoris SA, Dinis JMP. 1980. Modificação na epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Vale da Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 40: 49-54.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76 (9): 4350-4354.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. J. Infect. Dis. 186:1829-34.
- Van der Meide WF, Schoone GJ, Faber WR, Zeegelaar JE, De Vries HJC, Ozbek Y, Lai a Fat RFM, Coelho LIARC, Kasi M, Shalig HDFH 2005. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. J. Clin. Microbiol. 43(11):5560-5566.
- Vera LA, Santos JB, Macêdo VO, Magalhães AV, Ciuffo IA, Santos CG 2001. Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra, Bahia. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 34(3): 233-237.
- Walker J, Vasquez JJ, Gomez MA, Drummelsmith J, Burchmore R, Girard I, Ouellette M 2006. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. Molecular & Biochemical Parasitology 147: 64-73.
- Weigle K, Saravia NG 1996. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. Clin. Dermatol. 14:433-50.
- WHO - World Health Organization Disponível em < [http://www.who.int/Leishmaniasis/em\\_](http://www.who.int/Leishmaniasis/em_) > Acesso em 4 de janeiro de 2013.
- Xavier SC, Andrade HM, Monte SJH, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, Tafuri WL, Tafuri WL 2006. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different

anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. BMC Veterinary Research 2:17.

Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, el-Toum IA, Satti M, Ghalib HW, Kager PA 1992. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. Trans. R. Trop. Med. Hyg. 86 (5):505-7.

Zilberstein D, Shapira M 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. Annu. Rev. Microbiol. 48: 449-470.

Zurita AI, Rodríguez J, Piñero JE, Pacheco R, Carmelo E, delCastllo A, Valladares B 2003. Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513-663).

## 9 Anexo

**Tabela:** Identificação das proteínas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* reativas ao teste de Tafuri *et al.*, 2004. O código do “spot” corresponde às figuras 11, 12 e 13, respectivamente.

Código do “spot”	Nome da proteína (pI/Mr preditos)	GI	Sequencias dos peptídeos identificados (Da)	Percentual de cobertura	Score
A2	proteína de choque térmico 70 (5.33/55828)	gi 3386646	R.FEELCGDLFR.S (1285.6420) R.SVHDVVLVGGSTR.I (1325.7721) K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1965.9951)	7	160
A3	proteína de choque térmico 70 (5.33/55828)	gi 3386646	R.FEELCGDLFR.S (1285.7153) K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1966.1034)	5	135
A4	proteína de choque térmico 70 (5.33/55828)	gi 3386646	R.FEELCGDLFR.S (1285.8200) R.SVHDVVLVGGSTR.I (1325.9310) K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1966.2696)	7	154
A5	Subunidade beta da ATPase (5.14/ 56485)	gi 146088806	R.IFNVLGDAIDQR.G (1360.9100) K.GHGGFVSFAGVGER.T (1376.8731) R.DVEGQNVLLFIDNIFR.F (1892.2264)	8	159
A6					
A7	metalo-peptidase, Clan MA(E), Familia M32 (5.51/ 57378)	gi 401428054	K.IWHFDTDAGR.L (1217.6078) R.EHITQPVCNAR.S (1324.6697) R.LPEFFEAQPAFSQDNMR.K (2027.0805) R.IDADEVCYPLHVILR.Y (1813.0632) K.MQEYLGLSTEGR.D (1383.7171) ATGETLNPEYLHR.H (1500.8155)	15	292
A8					
A9	proteína de choque térmico 70 (5.36/71319)	gi 293059	K.SQIFSTYADNQPGVHIQVFEGEER.A (2622.0893) K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1965.9392)	6	60
A10	metalo-peptidase, Clan MA(E), Familia M32 (5.51/ 57378)	gi 401428054	K.IWHFDTDAGR.L (1217.6321) R.IDADEVCYPLHVILR.Y (1813.0273)	5	105

A11	proteína de choque térmico 70 (5.33/ 55828)	gi 3386646	K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1965.2445)	3	77
A12	PDI 52 kDa (5.13/52634)	gi 116293933	R.SQVLLTYIDGDQYRPVSR.Q (2109.9998) K.FPAFVVDYEHHR.H (1379.5858) K.FDVSGFPTIYFIPAGKPPVAYEGDR.T (2743.0021)	11	77
	proteína de choque térmico 70 (5.33/55828)	gi 3386646	K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1965.9011)	3	64
A13	proteína de choque térmico 70 (5.33/55828)	gi 3386646	K.SQIFSTYADNQPGVHIQVFEGER.A (2622.1853) K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G ( 1965.9514)	7	149
	proteína regulada por glicose 78 (5.19/68979)	gi 16797868	K.DNRLLGKFDLSGIPPAPR.G ( 1965.9514)	2	73
A14					
A15	beta-tubulina (4.69/50302)	gi 1296832	R.INVYFDESAGGR.Y(1327.1579) R.FPQLNSDLR.K (1146.1890) K.LAVNLVPPFR.L (1125.2825)	7	173
A16	proteína de choque térmico 70 (5.33/ 55828)	gi 3386646	K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G ( 1965.2419)	3	68
A17	proteína de choque térmico 70 (5.33/ 55828)	gi 3386646	K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1965.3084)	3	65
A18	proteína de choque térmico 70 (5.33/ 55828)	gi 3386646	K.SQIFSTYADNQPGVHIQVFEGER.A (2621.4880) K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G ( 1965.3446)	7	114
A19					
A20	alpha tubulina (4.89/ 50512)	gi 606648	R.CIFLDLEPTVVDEVR.T( 1804.3760)	3	63
A21	proteína de choque térmico 70 (5.33/ 55828)	gi 3386646	K.SQIFSTYADNQPGVHIQVFEGER.A (2621.5509) K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1965.4316)	7	115

A22	proteína de choque térmico 70 (6.25/56639)	gi 293059	K.GDDKPVISVQYR.G (1376.4330) K.AVVTVPAYFNDSQR.Q (1566.4392) R.LVTFTEEFK.R (1260.3493) R.LVTFTEEFKR.K (1416.4276)	7	168
A23	S-adenosilhomocisteína hidrolase (5.75/48364)	gi 146103697	K.SKFDNLYGCR.E (1259.3118) K.EHVEIKPQVDR.Y (1349.4379)	4	82
A24	proteína do choque térmico 70 (5.46/71382)	gi 239586186	K.EIEAALEWLSSNQEATK.E (1918.4463)	3	82
A25					
A26	cadeia epsilon da ATP sintase (5.10/20315)	gi 401426041	K.VVDKDIHSAYDNMETLR.L (2006.1909) K.ALAQQQSALSAHDDK.A(1684.0699)	18	64
A27					
A28					
A29	proteína do choque térmico 70 (5.36/71319)	gi 1552344	K.SQIFSTYADNQPGVHIQVFEGEER.A (2622.8138) K.DCHLLGTFDLGIPPAPR.G (1966.3836)	6	78
	alpha tubulina (4.89/50512)	gi 606648	R.CIFLDLEPTVVDEVR.T (1805.2514)	3	57
A30	proteína 1 relacionada a hsp 70, precursor mitocondrial (5.80/72089)	gi 146093966	K.VSNAVVTCPAYFNDAQR.Q (1911.7922) R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G (1879.9450)	5	86
A31	Proteína 1 relacionada a hsp 70, precursor mitocondrial (6.00/ 69317)	gi 146093964	K.VSNAVVTCPAYFNDAQR.Q (1912.0647) R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G (1880.1860)	5	80
A32					
A33					
A34					
B1					
B2					
B3	proteína do choque térmico 83 (5.05/80881)	gi 323650339	R.YQSLTDPSVLGEETHLR.I (1944.7203) K.ADLVNNLGTIAR.S (1256.9094) K.EDQQEYLEER.R (1338.8031)	5	125
B4	proteína do choque térmico 70	gi 1552344	R.SVHDVVLVGGSTR.I (1325.8513)	4	60

	(5.36/ 71319)		K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1966.2100)		
B5					
B6					
B7	subunidade E1 $\beta$ da piruvato dehidrogenase (5.64/38448)	gi 146089026	K.VIAPYNCEDAR.G (1307.1826) K.LAAEGVQAEVINLR.S (1482.3441)	7	75
B8	beta-tubulina (4.71/50339)	gi 154343836	R.MNVYFDESAGGR.Y (1345.1493) R.FPGQLNSDLR.K (1146.2295) R.KLAVNLVPPFR.L (1253.3583) K.LAVNLVPPFR.L (1125.3223)	7	171
B9	proteína do choque térmico-like protein (5.08/35619)	gi 154343245	R.AIYDIYGEEGVR.H (1384.8204) R.FFGVDNPFQVIGR.I (1495.9056)	7	98
B10	proteína do choque térmico-like protein (5.08/35619)	gi 154343245	R.AIYDIYGEEGVR.H (1384.6132) R.FFGVDNPFQVIGR.I (1495.6711) K.TGDHFTVEGR.G (1118.4722) R.GDVVIVVNMVQHTR.F + Oxidation (M) (1582.7051) R.ELSIDIDEIVDPTYR.T (1775.8190) R.IAGEGLPNHGGVDAPR.G (1559.7179) K.FPSFLTAEQK.T (1167.5032)	27	94
B11	alpha tubulina (4.89/ 50393)	gi 389600613	R.SLFLDLEPTVVDEVR.T (1731.8489) R.SLDIERPSYTNVNR.L (1663.7644) R.FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR.I (2409.1474)	11	97
B12	alpha tubulina (4.89/50512)	gi 606648	R.LIGQVVSSLTASLR.F (1443.5335)	3	69
B13					
B14	subunidade proteolitica do complexo hslvu like, treonina peptidase Clan T(1), familia T1B (5.85/23874)	gi 154346210	K.LNDFPDQLSR.A (1204.3687) R.ALIDVDGYDAER.I (1336.3974)	10	75
B15	proteína 1 relacionada a hsp 70, precursor mitocondrial (5.90/70998)	gi 154341833	R.RFEDEHIQR.D (1229.3100) R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G (1879.5696)	4	61
B16	proteína 1 relacionada a hsp 70, precursor	gi 154341831	R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G (1879.5835)	6	77

	mitocondrial (6.56/34948)				
B17	subunidade b da ATP sintase vacuolar (5.29/55837)	gi 154340667	K.AVVQVFEGTSGIDVIR.S (1690.0904) K.IPLFSGAGLPHNEIAAQIVR.Q (2103.4193) R.QLYPPINILPSLSR.L + Gln->pyro-Glu (N-term Q) (1594.0541) R.QLYPPINILPSLSR.L (1611.0970) K.FICQGFYETR.D (1320.7516)	12	177
B18	beta-tubulina (4.71/50339)	gi 154343836	R.MNVYFDESAGGR.Y (1345.7428) K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K (2034.2046) K.LAVNLVPPFR.L (1125.8167)	9	141
	alpha tubulina (4.89/50512)	gi 606648	R.LIGQVVSSLTASLR.F (1444.0011) R.FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR.I (2409.5207)	7	84
B19	proteína hipotética conservada (5.73/29227)	gi 154346772	R.SIVEGFAVDVQGTYYVNNNAVGR.Q (2195.3871) K.ETQASGEADYTTIPPPR.L (1833.1246)	14	138
	subunidade 5 $\alpha$ do proteasoma (5.25/26934)	gi 154343830	K.GPQLWQTDPSGTYTR.Y (1706.9974) R.YDAQAIGGGAEAAQSVFTER.Y (2041.2164)	14	61
B20	proteína hipotética conservada (4.73/22305)	gi 154334121	K.VYVLYFFNTFYR.G (1631.7261) R.LSPPHIVYDEGK.V (1354.6025)	12	61
B21	alpha tubulina (4.89/50393)	gi 389600613	R.SLFLDLEPTVVDEV.R.T ( 1731.5645)	3	66
B22	proteína paraflagelar rod 2C (5.40/69373)	gi 146082920	K.LLELSVYNCDLALR.C (1678.6193) R.LQVHQEYLEAFR.R (1532.5512)	4	100
B23	Proteína 14-3-3-like protein (4.84/29785)	gi 154346050	R.FDEMLLCIR.K (1196.8037) R.FDEMLLCIR.K + Oxidation (M) (1212.8076) K.ETSTTLPLVVNMR.K (1461.0934)	19	225

			R.YYAEIDPGDGQR.Q (1383.8760) K.ATDVANSSLAPTHPIR.L (1650.2479)		
B24	N-acil-L-aminoacido amidohidrolase (5.62/49315)	gi 389603990	K.VVQPEVVQWR.R (1239.9453) R.VGTIMGACNDFDIVIR.G (1781.2420)	5	84
B25					
C2					
C3	proteína do choque térmico 70 (5.36/71319)	gi 758136	R.SVHDVVLVGGSTR.I (1325.9963) K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1966.5075)	4	77
C4	proteína do choque térmico 70 (5.33/ 55828)	gi 3386646	R.FEELCGDLFR.S (1285.6583) R.SHDVVLVGGSTR.I (1325.7835) K.SQIFSTYADNQPVGVIQVFEGER.A (2622.4153) K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1966.2064)	12	104
C5					
C6	proteína do choque térmico 83 (5.08/ 81013)	gi 339898954	K.GVVDEDLPLNISR.E (1514.0596) K.LGIHEDTANR.K (1125.8705) K.KLESSPFIEQAR.R (1405.0622)	5	136
	proteína do choque térmico 83 (4.96/ 41849)	gi 154343718	K.GVVDEDLPLNISR.E (1514.0596) K.LGIHEDTANR.K (1125.8705) K.KLESSPFIEQAR.R (1405.0622)	10	134
C7					
C8					
C9					
C10					
C11					
C12	proteína conservada hipotética (5.17/41313)	gi 146105064	R.DWKDEAANEVAR.S (1404.1300) K.LQSQVFPDVSTFFR.F (1671.1973)	6	92

C13	1,2-Dihidroxi-3-ceto-5-metiltiopentano dioxigenase (5.30/32927)	gi 146099894	R.WYQEHYTEDEQFR.V 1830.8643 R.ATLDEDDYVALYR.G 1543.8012	9	96
	5.46 Proteína do choque térmico 70 (5.36/71319)	gi 1552344	K.SQIFSTYADNQPVGVIQVFEGEER.A (2622.3848) K.DCHLLGTDFDLGIPPAPR.G (1966.0675)	6	84
C14					
C15					
C16	proteína conservada hipotética (5.07/36426)	gi 146081345	R.NEAETGATEAFADTGDAPR.G (1923.0700) K.YIFSQSLQEAEVR.V (1569.9730)	9	105
C17	Fator de alongação da transcrição 1-β (4.61/23220)	gi 146104117	R.LNAQPFVSGFSPSEDAR.I (1908.9138) R.IFNEMFGSNVNVIQWVAR.M (2124.0924) R.IFNEMFGSNVNVIQWVAR.M + Oxidation (M) (2140.0855) R.IFNEMFGSNVNVIQWVAR.M + Oxidation (M) (2152.1453) R.MASYYYQAERDEILNAGTEK.K (2189.0491) K.AWDDTIDLEALAKK.L (1588.7329)	32	271
	fator de alongação 1-β (5.00/26061)	gi 401428375	K.AWDDTIDLEALAKK.L (1588.7329)	5	84
C18	beta-tubulina (4.69/50302)	gi 1296832	R.INVYFDESAGGR.Y (1327.3243) K.LAVNLVPFPR.L (1125.4396)	4	80
C19	beta-tubulina (4.69/50302)	gi 1296832	R.INVYFDESAGGR.Y (1327.2893) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A (1633.3437) K.LAVNLVPFPR.L (1125.3954)	8	129
	beta tubulina (4.71/ 50395)	gi 146078076	R.INVYFDESTGGR.Y (1357.2965) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A (1633.3437) K.LAVNLVPFPR.L (1125.3954)	8	100
	beta tubulina (4.61/ 12579)	gi 91983209	R.INVYFDESAGGR.Y (1327.2893) R.AVLMNLEPGTMDSVR.A (1633.3437)	23	79

C20	beta tubulina (4.74/ 50250)	gi 299829504	R.INVYFDESTGGR.Y (1357.4593) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A (1633.5652) R.AGPYQQLFRPDNFIFGQSGAGNNWAK.G (2812.1030) K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K (2033.6680) K.LREEYPDR.I (1077.4073) R.FPGQLNSDLR.K (1146.4540) R.KLAVNLVPFPR.L (1253.6141) K.LAVNLVPFPR.L (1125.5444) R.VGEQFTGMFRR.K (1327.4562)	25	82
C21	beta tubulina (4.74/ 50250)	gi 299829504	R.INVYFDESTGGR.Y (1357.3496) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A (1633.3986) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A + Oxidation (M) (1649.3882) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A + 2 Oxidation (M) (1665.3698) R.AGPYQQLFRPDNFIFGQSGAGNNWAK.G (2812.7079) K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K (2033.4963) K.LREEYPDR.I (1077.3061) R.IMMTFSVIPSPR.V (1378.3940) R.IMMTFSVIPSPR.V + Oxidation (M) (1394.3613) R.TLKLTTPTFGDLNHLVAAVMSGVTCCLR.F + Oxidation(M) (3091.8761) R.FPGQLNSDLR.K (1146.3473) R.KLAVNLVPFPR.L (1253.4722) K.LAVNLVPFPR.L (1125.4392) R.VGEQFTGMFRR.K (1327.3451)	34	96
C22	proteína hipotética conservada (4.92/26343)	gi 146103425	K.LMDQSLPVYDDVVTGVGR.L (1964.2661) K.LMDQSLPVYDDVVTGVGR.L + Oxidation (M) (1980.2477) R.VWHLFEADDTLMLEEHDR.E (2256.4084) R.DFHEFGVYLNAE.- (1440.8001)	21	199
C23	beta-tubulina (4.69/ 50302)	gi 1296832	R.INVYFDESAGGR.Y (1327.8586) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A (1634.0955) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A + Oxidation (M) (1650.0891)	15	304

	beta-tubulina (4.71/50395)	gi 146078076	R.AVLMDLEPGTMDSVR.A + 2 Oxidation (M) (1662.1279) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A + 2 Oxidation (M) (1666.1035) K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K (2034.3920) R.IMMTFSVIPSPR.V (1385.9264) R.FPGQLNSDLR.K (1146.7997)	15	289
	beta-tubulina (4.61/12579)	gi 91983209	R.INVYFDESTGGR.Y (1357.8873) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A (1634.0955) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A + Oxidation (M) (1650.0891) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A + 2 Oxidation (M) (1662.1279) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A + 2 Oxidation (M) (1666.1035) K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K (2034.3920) R.IMMTFSVIPSPR.V (1385.9264) R.FPGQLNSDLR.K (1146.7997)	23	167
C24					
C25					
C26					
C27	beta-tubulina (4.69/ 50302)	gi 1296832	R.INVYFDESAGGR.Y (1327.7349) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A (1633.9270)	10	149

	beta tubulina (4.61/ 12579)	gi 91983209	R.AVLMDLEPGTMDSVR.A + Oxidation (M) (1649.9015) K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K (2034.1635)  R.INVYFDESAGGR.Y ( 1327.7349) R.AVLMNLEPGTMDSVR.A ( 1633.9270) R.AVLMNLEPGTMDSVR.A + Oxidation (M) (1649.9015)	23	99
C28	beta-tubulina (4.69/50302)	gi 1296832	R.INVYFDESAGGR.Y (1327.7084) K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K (2034.1215)	6	113
	beta tubulina (4.71/ 50395)	gi 146078076	R.INVYFDESTGGR.Y ( 1357.7073) K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K ( 2034.1215)	6	110
	proteína hipotética conservada (4.63/22563)	gi 146081233	R.QQFLQTHTVNQSFR.E + Gln->pyro-Glu (N-term Q) (1831.0111) R.QQFLQTHTVNQSFR.E + Gln->pyro-Glu (N-term Q) (1833.0852) R.QQFLQTHTVNQSFR.E (1848.0387)	7	101
C29	beta-tubulina (4.68/ 50278)	gi 110816092	K.MSVTFIGNNTCIQEMFR.R (2048.2848) R.VGEQFTGMFR.R (1171.6940)	6	90