



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



**Abordagem proteômica para identificação de fatores
de virulência em duas cepas de *Leishmania infantum***

Luiz Carlos Fialho Júnior

Belo Horizonte

2013



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



Abordagem proteômica para identificação de fatores de virulência em duas cepas de *Leishmania infantum*

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

Orientadora: Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade

Co-orientadora: Dra. Simone da Fonseca Pires

Belo Horizonte

2013

“O ser humano vivência a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo – em uma espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior.”

- *Albert Einstein*

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente agradeço a Deus por tudo.
- Ao meu pai Luiz Carlos e minha mãe Carla, que sempre me incentivaram, me deram força e base para ser o que sou hoje. Agradeço todo o amor e o carinho que me deram por toda a vida.
- À Tarcila, meu amor, pelo companheirismo, amor e amizade, me ajudando a superar as dificuldades, me incentivando e me tornando uma pessoa melhor a cada dia. Obrigado pelo apoio incondicional. Te amo demais!
- Aos meus Familiares e amigos, sou uma pessoa de sorte por ter vocês. Lucas meu amigo, vai com Deus! Sentiremos muita saudade.
- À minha orientadora e Prof. Héliida Monteiro de Andrade, que me aceitou em seu laboratório e compartilhou comigo seus conhecimentos e experiências, contribuindo para que esse trabalho fosse realizado. Obrigado pela oportunidade, paciência e carinho.
- À minha co-orientadora Simone da Fonseca Pires, pelas incontáveis ajudas nos experimentos e análises, além da enorme paciência em me ensinar como trabalhar em um laboratório.
- À melhor turma de mestrado que a UFMG já teve, Turma do Pepino, obrigado pela ótima convivência. Foi pouco tempo, mas valeu pra vida toda.
- Aos meus amigos do laboratório: Luciano, Mariana, Jordana, Aliani, Bruna, Talita, Janaína, Nayara, Ana Paula, Aretha, João Carlos, André e Elaine, que tornam o dia-a-dia muito mais alegre.
- À Prof. Dra. Maria Norma Melo e Soraia de Oliveira Silva pela gentileza de nos fornecer os parasitos utilizados no presente trabalho.
- Ao Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri pelo auxílio nas análises histopatológicas.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFMG.
- A todos os funcionários, professores e alunos do Departamento de Parasitologia da UFMG.
- Às agências financiadoras CNPq e CAPES.

RESUMO

Leishmania infantum, sinónimo com *L. chagasi*, é o protozoário responsável pela Leishmaniose Visceral nas Américas e na Europa, uma doença grave, podendo ser fatal se não tratada. Os casos humanos variam desde infecção sub-clínica, com um número indeterminado de assintomáticos em áreas endêmicas, até um quadro crescente de co-infecção com HIV e alta letalidade em crianças. Em cães, a doença é severa, caracterizada por crônica e progressiva caquexia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, onicogribose e pancitopenia. Porém, menos de 60% dos cães infectados apresentam sinais clínicos da doença, sugerindo que tanto fatores do hospedeiro quanto do parasito podem estar envolvidos na variabilidade clínica da doença. Assim, devido a sua importância e diversidade clínico-epidemiológica em nosso país, o estudo de fatores de virulência em *L. infantum* mostra-se bastante promissor para um melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro. Neste estudo, inicialmente foi caracterizada a virulência entre duas cepas de *L. infantum* (BH46 e BH400) e em seguida foi comparada a expressão diferencial de proteínas entre as cepas. Dessa forma, através de eletroforese bidimensional e *Differential Gel Electrophoresis* (DIGE), foram avaliados os perfis proteômicos das formas promastigota entre as diferentes cepas. Posteriormente, as proteínas foram identificadas por Espectrometria de Massas. Essas análises nos permitiram selecionar e identificar proteínas possivelmente associadas à diferença de virulência entre as cepas BH46 e BH400, entre elas estão a Triparredoxina, S-Adenosil Homocisteína Hidrolase, HSP- 70, Metallo-Peptidase, Clan MA(E), Família M3, Enolase, Fosfomanomutase, Peroxirredoxina, proteína 14-3-3 like, proteína Rab 1 ligante à GTP e KMP-11. Através da predição da rede de interações entre as proteínas, foi observado que muitas vezes as proteínas descritas como envolvidas na virulência interagem entre si, tornando importante o estudo de todos os complexos proteicos globais do organismo, e não apenas uma proteína individualmente. Assim, a caracterização de fatores envolvidos com a diferença de virulência entre BH46 e BH400 permitirá um melhor entendimento sobre a relação parasito-hospedeiro.

ABSTRACT

Leishmania infantum, synonymy with *L. chagasi*, is the protozoan responsible for Visceral Leishmaniasis in the Americas and Europe, a serious disease that can be fatal if untreated. Human cases range from subclinical infection, with an undetermined number of asymptomatic patients in endemic areas, a growing cadre of co-infection with HIV and high mortality in children. In dogs, the disease is severe, characterized by chronic and progressive cachexia, hepatosplenomegaly, lymphadenopathy, and pancytopenia onychogryphosis. However, less than 60% of the infected dogs present clinical signs of the disease, suggesting that host and parasite factors are involved in clinical variability of disease. Thus, due to its importance and clinical and epidemiological diversity in our country, the study of virulence factors in *L. (L.) infantum* appears to be quite promising for understanding the host-parasite relationship. This study compared the differential expression of proteins between two strains of *L. (L.) infantum* (BH46 and BH400) with difference in virulence. Therefore, using two-dimensional electrophoresis and Differential Gel Electrophoresis (DIGE) will be assessed proteomic profiles of promastigote forms between different strains. These analyzes allowed us to select and identify proteins possibly related to the difference in virulence between strains BH46 and BH400, among them are the Tryparedoxin, S-Adenosyl homocysteine Hydrolase, HSP-70, Metallo-Peptidase, Clan MA(E) Family M3, Enolase, Phosphomannomutase, Peroxiredoxin, 14-3-3 protein like protein, GTP binding protein Rab 1 and KMP-11. Through the prediction of the network of interactions between the proteins was observed that often described as proteins involved in virulence interact with each other making important to study all overall organism protein complexes, and not only a protein individually. Thus, the characterization of factors involved in the virulence difference between BH46 and BH400 will enable a better understanding of the host-parasite relationship.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das análises entre BH400 e BH46. Foram realizadas 2 análises das imagens: Análise de Reprodutibilidade do Perfil Proteômico entre as 3 imagens da forma evolutiva Promastigota de cada uma das cepas separadamente; e a Análise de Expressão Diferencial de proteínas entre promastigotas das diferentes cepas..... Pág. 34

Figura 2: Esquema da análise das imagens obtidas dos géis fluorescentes utilizando o software DeCyder™ 2D Differential Analysis Software v7.2 (GE Healthcare).... Pág. 34

Figura 3: Definição dos parâmetros utilizados na seleção dos *spots*. **Área:** área expressa em pixels dentro de um *spot* delimitado. **Slope:** Medida dos atributos tridimensionais do *spot*..... Pág. 35

Figura 4: Curva de crescimento de *L. infantum* na forma Promastigota em meio α-MEM completo..... Pág. 39

Figura 5: Avaliação da virulência *in vitro* das cepas BH46 e BH400 de *L. infantum*. Macrófagos (10^5) foram infectados com promastigotas (10^6) de cada cepa e coradas pelo Giemsa. A porcentagem de células infectadas (A) e o número de parasitos/célula (B) foram determinados com a média das triplicatas..... Pág. 40

Figura 6: Avaliação da virulência *in vivo* das cepas BH46 e BH400 de *L. infantum*. Grupos de 6 hamsters foram infectados com 10^5 amastigotas de cada cepa separadamente. Foram avaliados os pesos dos animais infectados (A), dos fígados (B), dos baços (C)..... Pág. 41

Figura 7: HE dos fígados de animais infectados com BH46 e BH400. Cortes histológicos de fígados infectados com BH46 (A) e BH400 (B). Seta grande – granuloma intralobular; macrófagos (células epitelióides) – cabeça da seta; Plasmócitos e linfócitos – setas finas. DB- ducto biliar; VC- veia centro lobular; S- sinusóide. (C) Histopatologia do baço e (D) Histopatologia do fígado. A Análise Histopatológica foi realizada considerando a extensão da lesão e as amostras foram classificadas com *score* de intensidade das alterações: 1 – sem alteração; 2 – discreto; 3 – moderado e 4- intenso..... Pág. 42

Figura 8: Imunohistoquímica dos fígados de animais infectados com BH46 e BH400. Cortes de fígado infectados com BH46 (A) e BH400 (B). Seta grande – granuloma intralobular; macrófagos (células epitelióides) – cabeça da seta. Foi determinado o número de amastigotas nos órgãos infectados (C)..... Pág. 43

Figura 9: Quantificação da carga parasitária por diluição seriada dos baços de animais infectados com as cepas BH46 e BH400..... Pág. 44

Figura 10: Géis Bidimensionais SDS-PAGE a 12% corados por *Coomassie Brilliant Blue G-250*, de *strips* de 7 cm de comprimento, de pH 4-7 com 150µg de proteínas de promastigotas. (A) cepa BH46 com 782 *spots* detectados e (B) cepa BH400 com 761 *spots* detectados..... Pág. 45

Figura 11: Géis Bidimensionais SDS-PAGE a 12% corados por *Coomassie Brilliant Blue G-250*, de *strips* de 18 cm de comprimento, de pH 4-7 com 600µg de proteínas de promastigotas das cepas: BH46 (A e C) e BH400 (B e D)..... Pág. 46

Figura 12: Géis Bidimensionais SDS-PAGE a 12% de *strips* de 18 cm de comprimento, de pH 4-7 demonstrando o Perfil Proteômico entre as imagens de promastigota da cepa BH400 (Imagens A, B e C) e da cepa BH46 (Imagens D, E e F) com uma alta reprodutibilidade..... Pág. 47

Figura 13: *Scatter Plot* representando (eixo X) a relação entre os valores de % de volume de cada *spot* com os valores (eixo Y) de % de volume do gel usado como referência para a comparação. Corr: Índice de Correlação; Count: Quantidade de *match* entre os géis..... Pág. 48

Figura 14: Géis Bidimensionais Fluorescentes de promastigotas de *L. infantum* das cepas BH46 e BH400, em *strips* de 18cm pH 4 – 7 com 50 µg de proteína de cada amostra utilizada. A – Mix das amostras marcadas com Cy2 utilizado para a normalização, sendo o controle interno da reação; B – Promastigota da cepa BH46 marcado com Cy3; C – Promastigota da cepa BH400 marcado com Cy5; D – Sobreposição das 3 imagens (Cy2, Cy3 e Cy5) do Gel fluorescente 1; E – Mix das amostras marcadas com Cy2 utilizado para a normalização, sendo o controle interno da reação; F – Promastigota da cepa BH400 marcado com Cy3; G – Promastigota da cepa BH46 marcado com Cy5; H – Sobreposição das 3 imagens (Cy2, Cy3 e Cy5) do Gel fluorescente 2..... Pág. 50

Figura 15: Imagem representativa da diferença de expressão entre um *spot* da cepa BH46 (A) e a demonstração tridimensional do *spot* (C) em relação ao mesmo *spot* de promastigota da cepa BH400 (B) e sua demonstração tridimensional (D). *Spot* da cepa BH400 (F) e sua demonstração tridimensional (H) mais expresso quando comparado ao mesmo *spot* da cepa BH46 (E) e sua demonstração tridimensional (G)..... Pág. 51

Figura 16: Agrupamento hierárquico (Pattern Analysis) das 2 cepas com base no padrão de *spots* globais detectados. Os valores de expressão relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; verde) para 1 (regulado-positivamente; vermelha)..... Pág. 52.

Figura 17: Agrupamento hierárquico (Pattern Analysis) das 2 cepas com base no padrão de *spots* diferencialmente expressos ($P \leq 0,05$) selecionados (*spots* de interesse). Os valores de expressão relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; verde) para 1 (regulado-positivamente; vermelha)..... Pág. 53

Figura 18: *Spots* selecionados através de *Test T Student* e *One-Way ANOVA* ($P \leq 0,05$) e numerados em géis bidimensionais de promastigota de *L. infantum* das cepas BH46 e BH400 respectivamente, em *strips* de 18cm, pH 4 – 7 com 600 µg de proteína, corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Em A – *spots* mais expressos em Promastigota da cepa BH46 e numerados de 1 até 72; B – *spots* mais expressos em Promastigota da cepa BH400 e numerados de 401 até 478..... Pág. 54

Figura 19: Categorização funcional das proteínas identificadas por Espectrometria de Massa das cepas BH46 e BH400. Ao todo, as proteínas foram agrupadas em 14 categorias funcionais, sendo que 12 delas contendo as proteínas expressas na cepa BH46 e 13 contendo proteínas expressas na cepa BH400..... Pág. 66

Figura 20: Rede de interações entre proteínas identificadas e relacionadas com a virulência (em vermelho) em BH400 através do banco de dados *String 9.0* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* - <http://string-db.org>): 1 - Fator de Elongação 2; 2 - Proteína Rab 1 ligante a GTP; 3 - S-adenosil homocisteína hidrolase; 4 – Fosfomanomutase; 5 - S-adenosil homocisteína hidrolase; 6 - Precursor da proteína Reiske Ferro-Enxofre; 7 - Triparredoxina Peroxidase; 8 - Triparredoxina Peroxidase; 9 - Proteína 14-3-3 like; 10 - Proteína de membrana de Kinetoplastideos 11 kDa (KMP-11); 11 - Subunidade alpha 2 do Proteasoma; 12 - Proteína de membrana de Kinetoplastideos 11 kDa (KMP-11); 13 - Triparredoxina Peroxidase; 14 – peroxirredoxina; 15 – Triparredoxina; 16 - Endorribonuclease L-PSP (pb5); 17 - S-adenosil homocisteína hidrolase; 18 – Enolase; 19 - Proteína de Choque Térmico-70 (HSP-70); 20 - Metallo-Peptidase, Clan MA(E), Família M3..... Pág. 68

Figura 21: Rede de interações entre proteínas identificadas e relacionadas com a virulência (em vermelho) em ambas as cepas através do banco de dados *String 9.0* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* - <http://string-db.org>): 1 – Triparredoxina; 2 – Peroxirredoxina; 3 – Enolase..... Pág. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema de marcação com CyDye dos extratos protéicos: As proteínas de promastigota das cepas foram marcadas com 3 fluoróforos CyDye (Cy2, Cy3 e Cy5), de modo ocorrer a inversão da marcação com diferentes fluoróforos. Foi realizado um terceiro gel, réplica do GEL 1, para poder realizar análises estatísticas pelo programa de análise - DeCyder™ 2-D *Differential Analysis Software* v7.2 (GE - Healthcare), pois é necessário ter no mínimo 3 imagens de cada amostra coradas pelo menos uma vez com cada fluoróforo para que seja possível realizar o teste estatístico..... Pág. 32

Tabela 2: Dados sobre a seleção e identificação dos *spots* através da Espectrometria de Massa. Os *spots* enumerados que estão em vermelho foram identificados pelo MALDI, os demais não obtiveram um *score* significativo..... Pág. 55

Tabela 3: Lista de proteínas identificadas, com o número do *spot*, a massa molecular e o pI preditos e experimentais dessas proteínas, além do *GenInfo Identifier* (GI) e em qual cepa foram super-expressas..... Pág. 57

Tabela 4: Categorização funcional das proteínas identificadas pelo MALDI, através do banco de dados FunCat - Functional Catalogue of Proteins, MIPS – *Munich Information Center for Protein Sequences* (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/>). O ID do banco de dados *String* 9.0 (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* - <http://string-db.org>) também está sendo demonstrado, onde foi realizada uma predição da interação entre as proteínas identificadas com proteínas já existentes ou preditas; A identificação do *spot* e o total de proteínas pertencentes à essa categoria funcional..... Pág. 61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 2-DE – Eletroforese Bidimensional.
- α -MEM – Meio mínimo Essencial.
- BVA – Análise de Variação Biológica (*Biological Variation Analysis*).
- CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal.
- CHAPS – 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanesulfonato.
- DIGE – Gel de Eletroforese Diferencial (*Differential Gel Electrophoresis*).
- DIA – Análise Diferencial no gel (*Differential in-gel Analysis*).
- DTT – Ditioneitol.
- EDA – Análise de Dados Estendido (*Extended Data Analysis*).
- FunCat – Catálogo Funcional (*Functional Catalogue*)
- GI – Identificador *GenInfo*.
- GILPS – Glicoinositolfosfolipídeos
- GO – *Gene Ontology*
- HSP-70 – Proteína do Choque Térmico – 70
- IAA – Iodoacetamida.
- ICAT – *Isotope Coded Affinity Tag*.
- IEF – Focalização Isoelétrica.
- IPG – Gradiente de pH Imobilizado (*Immobilized pH Gradient*).
- KMP-11 – Proteína de Membrana de Kinetoplastídeos 11 kDa
- LPG – Lipofosfoglicano.
- LV – Leishmaniose Visceral.
- pI – Ponto Isoelétrico
- MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization .
- MM – Massa Molecular
- MSP – *Major Surface Protease*.
- NN-LIT – Meio Bifásico *Liver Infusion Tryptose*.
- PBH – Prefeitura de Belo Horizonte.
- PPG - Proteofosfoglicanos
- SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio.
- ToF/ToF – Tempo de voo (*Time of Flight*).
- WHO – Organização Mundial da Saúde.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do protocolo experimental usado (CETEA – Protocolo 232/2010)..... Pág. 91

Anexo 2 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas entre BH400 e BH46 de *L. infantum*. Sequência dos peptídeos confirmados no MALDI ToF/ToF; a função molecular através da consulta no banco de dados UniProt.org; a área de cobertura necessária para que a proteína pudesse ser encontrada no banco de dados; o *score* da proteína..... Pág. 92

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Material biológico.....	27
4.2 Caracterização da virulência <i>in vitro</i>	28
4.2.1 Infecção de macrófagos.....	28
4.3 Caracterização da virulência <i>in vivo</i>	28
4.3.1 Avaliação Histopatológica.....	28
4.3.2 Imuno-histoquímica.....	29
4.3.3 Diluição sucessiva.....	29
4.4 Análise Proteômica.....	30
4.4.1 Obtenção das proteínas.....	30
4.4.2 Eletroforese Bidimensional (2-DE)	30
4.4.3 <i>Differential Gel Electrophoresis</i> (DIGE).....	32
4.4.4 Análise <i>in silico</i> dos géis.....	33
4.4.5 Espectrometria de Massa (MS)	37
4.5 Organização dos Dados Proteômicos.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Material Biológico.....	39
5.2 Caracterização da virulência <i>in vitro</i>	39
5.3 Caracterização da virulência <i>in vivo</i>	40
5.3.1 Avaliação Histopatológica.....	41
5.3.2 Imuno-histoquímica.....	43
5.3.3 Diluição sucessiva.....	43
5.4 Análise Proteômica.....	44
5.4.1 <i>Differential Gel Electrophoresis</i> (DIGE).....	49

5.5 Identificação das Proteínas.....	55
5.6 Organização dos Dados Proteômicos.....	60
6. DISCUSSÃO.....	70
7. CONCLUSÃO.....	79
8. REFERÊNCIAS.....	80
9. ANEXOS.....	91

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903), pertence à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, Classe Zoomastigophora, Sub-Filo Mastigophora, Filo Sarcomastigophora. São protozoários transmitidos através da picada de flebotomíneos fêmeas do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas) (Neuber, 2008). Apresentam ciclo de vida heteroxênico, sendo que as formas promastigotas são flageladas livres ou estão aderidas ao trato digestivo dos hospedeiros invertebrados. Enquanto as formas amastigotas possuem flagelo retraído e são intracelulares obrigatórias no hospedeiro vertebrado (McNicoll, 2006).

A *Leishmania* é transmitida durante a hematofagia do flebotomíneo fêmea infectado, onde o parasito na forma flagelada promastigota metacíclica é regurgitada, infectando o hospedeiro vertebrado. Essas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e dentro do vacúolo parasitóforo, passam por mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas e se diferenciam em formas arredondadas com flagelo retraído, denominadas amastigotas. Em seguida, ocorre a fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal, no qual o parasito permanece em um ambiente hostil, contendo enzimas lisossomais, metabólitos reativos do oxigênio, mecanismos de sinalização celular, citocinas e produção de óxido nítrico (Cunningham, 2002). No entanto, a *Leishmania* está adaptada para sobreviver neste ambiente, sendo capaz de inibir diversos mecanismos de defesa celular responsáveis por causar a destruição do parasito, e então se multiplicar por divisão binária, até levar a ruptura da célula infectada e liberar formas amastigotas que são fagocitadas por outros macrófagos (Peters, 2008).

O inseto vetor se infecta através da ingestão de macrófagos contendo formas amastigotas que acompanham o sangue e tecido do hospedeiro vertebrado infectado. No trato digestivo anterior do flebotomíneo, as amastigotas transformam-se rapidamente em promastigotas, que se multiplicam, aderidas à parede do intestino e colonizam o trato digestivo do inseto. Em seguida, os parasitos migram para a região anterior do intestino onde uma parte deles se transformam em promastigotas metacíclicas, formas

infectantes para o hospedeiro vertebrado (Sacks & Noben-Trauth, 2002; Cuervo *et al*, 2010).

Protozoários do gênero *Leishmania* são agentes etiológicos de um complexo de doenças que possuem um amplo espectro de sinais clínicos, variando desde lesões cutâneas que podem ser auto-limitantes até a visceralização, muitas vezes fatal se não tratada adequadamente. Essas doenças estão presentes em 88 países com aproximadamente 12 milhões de infectados e 350 milhões de pessoas em risco de contrair a infecção (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>). No Brasil, o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV), forma mais grave da doença, é a *Leishmania (Leishmania) infantum* (= *L. (L.) chagasi*).

No homem, a progressão da doença é determinada pela espécie do parasito, da cepa, da resposta imune e estado nutricional do hospedeiro. Essa variação de sinais clínicos pode ser dividida basicamente em duas doenças distintas: Leishmaniose Tegumentar e Visceral. A forma Tegumentar pode ser subdividida em Cutânea (associada frequentemente às espécies *Leishmania (Leishmania) major*, *L. (L) tropica*, *L. (L) mexicana* e *L. (Viannia) braziliensis*), Mucocutânea (associada principalmente por *L. (V) braziliensis* e *L. (L) tropica*) e Difusa (associada a *L. (L) amazonensis*, *L. (V) guyanensis* e *L. (L) aethiopica*); e Leishmaniose Visceral, podendo ser causada por *L. (L) donovani* ou por *L. (L.) infantum* (= *L. (L.) chagasi*) (Silveira *et al*, 2004, Castellano, 2005).

A Leishmaniose Visceral (LV) é a forma mais severa da doença, sendo causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani* na África, Ásia, Europa e nas Américas (Gontijo e Melo, 2004). No Leste Africano e na Ásia, a doença é uma antroponose causada pela espécie *L. (L) donovani*. Nas Américas e na Europa, a espécie responsável pela doença é a *L. (L.) infantum/chagasi* e diferentemente da *L. (L) donovani*, essas espécies são responsáveis por causar zoonose (Gontijo e Melo, 2004; Chappuis, 2007).

A classificação taxonômica de *Leishmania* agrupa dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, e essa classificação baseia-se através de aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares. Os parasitos do subgênero *Viannia*, desenvolvem-se no intestino posterior do vetor, migrando-se posteriormente para o intestino médio e anterior. Por outro lado, os parasitos do subgênero *Leishmania*, desenvolvem-se apenas no intestino médio e posterior (Laison e Shaw, 1979).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO) ocorrem 500.000 novos casos por ano de LV, sendo que a forma causada por *L. (L.) infantum*, representa 20% da leishmaniose visceral humana mundial (100.000 casos anualmente) e sua incidência é crescente nas áreas urbanas e peri-urbanas dos trópicos (WHO, 2009).

Dentre os 88 países acometidos pelas Leishmanioses, cinco merecem atenção especial por representarem cerca de 90% dos casos de Leishmaniose Visceral: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Venezuela e Brasil. Do Brasil são procedentes cerca de 97% dos casos humanos de LV descritos na América do Sul (<http://www.who.int/>), onde há um crescente aumento tanto das áreas de ocorrência quanto do número de casos. A região metropolitana de Belo Horizonte, nos últimos anos, registrou um aumento nos casos de LV, sugerindo um aumento na taxa de transmissão da doença. Entre 1994 a 2009, foram confirmados 1.215 casos de LV no município de Belo Horizonte. As taxas de letalidade são altas (a média dos últimos 11 anos é de 13%), sendo 19,3% em 2009 (PBH).

No homem, a LV acomete frequentemente crianças, idosos e pode ser considerada uma doença oportunista em pacientes portadores do vírus HIV, ou sob tratamentos com imunossupressores, indicativo de que o estado imune do hospedeiro é importante fator na infecção por *L. (L.) infantum* (Oliveira *et al*, 2008).

Em cães, a forma assintomática da doença apresenta índices entre 40 e 60% dos casos, o que dificulta muito no diagnóstico, sendo conseqüentemente, um fator determinante na disseminação, prejudicando o controle da doença. Na região endêmica de Belo Horizonte, MG, estudos demonstram uma correlação entre a LV canina e a humana, com os casos caninos antecedendo os casos humanos (Souza *et al*, 2005).

O desenvolvimento da doença não é influenciado pelo sexo ou a raça do hospedeiro, porém em relação à idade, observa-se que crianças e idosos são mais susceptíveis, devido à baixa imunidade (Pearson *et al*, 1992).

Após a cura da infecção primária, indivíduos se tornam resistentes às infecções futuras na maioria dos casos, o que sugere a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina contra Leishmaniose. Porém, até o momento não foi produzida uma vacina comprovadamente eficaz contra a doença, sendo a utilização de antimonials a principal forma de tratamento da LV (Ouellette e Papadopoulou, 2004).

Estas observações, juntamente com a diversidade clínica exibida pelos hospedeiros na infecção por *L. infantum*, sugerem que tanto fatores do hospedeiro

quanto do parasito possam estar envolvidos na variabilidade clínica da doença. Assim, devido a sua importância e diversidade clínico-epidemiológica em nosso país, a *L. infantum* parece constituir um excelente modelo para estudos de fatores de virulência.

As proteínas são as moléculas responsáveis pela determinação dos fenótipos celulares em todos os organismos, de procariotos a eucariotos. Conseqüentemente, os fatores de virulência em *Leishmania* estão relacionados com a expressão protéica, esta por sua vez pode ser estudada por meio dos níveis de mRNA ou das proteínas propriamente ditas. No entanto, em *Leishmania*, níveis de mRNA não necessariamente indicam a respectiva abundância de proteínas, podendo assim serem dados parcialmente enganosos (Anderson *et al*, 1997; Gygi *et al*, 1999), além de não informar níveis de modificações pós-traducionais, que podem mudar drasticamente a funcionalidade desempenhada pela proteína. Os Trypanosomatídeos regulam a expressão de proteínas, principalmente através de modificações pós-transcricionais e traducionais (Clayton *et al*, 2002; Rosenzweig *et al*, 2008; Paape *et al*, 2011).

A Eletroforese Bidimensional (2-DE) é reconhecida como o método de separação mais simples e eficaz para a análise global de proteínas, uma vez que pode ser utilizado para analisar diferenças de expressão e as modificações pós-traducionais, com auxílio da Espectrometria de Massas (Brobey *et al*, 2007).

As primeiras tentativas de estudos proteômicos realizados de *Leishmania*, foram publicados em 1980 e 1984 por Handman *et al*, 1980 e Saravia *et al*, 1984, porém nenhuma proteína foi identificada, devido aos dados do genoma ainda não-sequenciado, impossibilitando a identificação das proteínas. Entretanto, a identificação de proteínas retiradas de géis bidimensionais através da Espectrometria de Massa (Paape e Aebischer, 2011) passou a ter maior sucesso após o sequenciamento do genoma de *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* e disponibilidade virtual desses dados (Ivens *et al*, 2005; Peacock *et al*, 2007)

O primeiro estudo no qual se analisou proteínas que foram excisadas de géis bidimensionais e identificadas através da Espectrometria de Massa foi realizado por El Fakhry *et al*, 2002, onde foram comparados formas evolutivas (Promastigota e Amastigotas Axênicas) de *L. infantum*, quando foram observadas 62 proteínas com diferenças de expressão. O genoma de *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* ainda não havia sido sequenciado, portanto a identificação foi realizada utilizando-se a sequência de amino ácidos encontrados e através de buscas de proteínas homólogas utilizando o

algoritmo BLAST, que necessita de um alto grau de seqüências conservadas para identificação das proteínas. Devido a isso, foram identificadas apenas duas proteínas (Isocitrate Dehydrogenase e Triosephosphate Isomerase).

Após o banco de dados GeneDB se tornar disponível publicamente, fornecendo uma plataforma inicialmente para o genoma de *L. major* (2005) e posteriormente para os genomas sequenciados de *L. infantum* e *L. braziliensis* (2007), houve um significativo aumento no número de estudos e também de proteínas de *Leishmania* sendo identificadas através de análises proteômicas (Hertz-Fowler *et al*, 2004).

Walker e colaboradores (2006) avaliaram diferenças de expressão nas proteínas estágio-específicas entre amastigotas axênicas e promastigotas de *L. panamensis*. Encontraram em amastigotas axênicas 75 proteínas e em promastigotas, 45 proteínas que foram diferencialmente expressas (Walker *et al*, 2006).

Proteínas imunogênicas de promastigotas de *L. infantum* foram avaliadas por Dea-Ayuela e colaboradores (2006), e através de Géis Bidimensionais, Western blot e Espectrometria de Massa, foram identificadas 29 proteínas, em um total de 72 *spots* (Dea-Ayuela *et al*, 2006). No mesmo ano, Forgber e colaboradores (2006), avaliaram em um gel bidimensional com 1067 *spots*, aqueles *spots* imunogênicos, reconhecidos no Western Blot. De 330 *spots* antigênicos, 6 proteínas foram identificadas por Espectrometria de Massa (Forgber *et al*, 2006).

Alguns autores vêm desenvolvendo técnicas para aumentar o número de proteínas identificadas, o que é especialmente interessante para a construção de mapas proteômicos. Por exemplo, McNicoll e colaboradores (2006) utilizaram um pré-fractionamento com precipitações de diferentes concentrações de Sulfato de Amônio nas amostras de Promastigotas e Amastigotas de *L. infantum* de forma a aumentar a cobertura proteômica. Proteínas nas frações contendo 40 a 80% de Sulfato de Amônio foram utilizadas em géis bidimensionais, e foram detectados 2261 e 2273 em promastigotas e amastigotas, respectivamente. Foram identificadas no Espectrometro de Massa 168 proteínas, originadas de 71 genes diferentes. Cuervo e colaboradores (2007) realizaram um estudo proteômico para identificar proteínas expressas em promastigotas de *L. braziliensis*, através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. 75 proteínas, em um total de 160 *spots* foram identificados por MALDI ToF/ToF. Os genes correspondentes às proteínas identificadas estão presentes em 25 dos 35 cromossomos de *L. braziliensis*. As proteínas mais abundantes identificadas por este trabalho foram

fatores de alongamento, HSP-70 e outras chaperonas, assim como dados encontrados em trabalhos semelhantes envolvendo outras espécies de *Leishmania*.

Alguns estudos proteômicos são realizados com o objetivo de identificar proteínas de frações celulares. Para um pré-fracionamento em membranas Foucher e colaboradores (2006) utilizaram uma solubilização diferencial através de digitonina, um detergente não-iônico. Avaliaram através de géis bidimensionais extratos protéicos de promastigotas e amastigotas axênicas de *L. infantum*, em diferentes concentrações de digitonina (100 µM, 500 µM e 5 mM). A quantidade de *spots* detectados foram 983, 883, 286 e 1086 para a concentração de 100 µM, 500 µM, 5 mM e proteínas não-solubilizadas, respectivamente. Um total de 153 proteínas foram identificadas, sendo 43 proteínas hipotéticas.

Análises Proteômicas em *Leishmania* também são utilizadas para análise de expressão diferencial de proteínas com distintas abordagens e objetivos. Leifso *et al*, 2007, através da técnica de proteoma quantitativa ICAT (*Isotope Coded Affinity Tag*) identificaram proteínas diferencialmente expressas de promastigotas e amastigotas axênicas de *L. infantum*. Identificou com sucesso 91 proteínas, e observou que 8% delas, eram diferencialmente expressas na forma amastigota. 20% eram diferencialmente expressas em promastigotas e os 72% restantes das proteínas foram considerados proteínas constitutivas. Vergnes e colaboradores (2007) avaliaram isolados resistentes e susceptíveis de *L. donovani* na Índia ao antimonial Sb(V). Foram identificadas 11 proteínas e dentre as proteínas identificadas estão a HSP83, proteína 14-3-3 e SKCRP14.1 (small kinetoplastid calpain-related protein), relacionada com programação de morte celular em alguns organismos, indicando a alteração da morte celular em parasitos resistentes. Rosenzweig *et al*, 2008, realizaram um trabalho utilizando o método iTRAQ de marcações isobáricas para quantificação relativa e absoluta durante a diferenciação de formas promastigotas em amastigotas axênicas. Um total de 1713 proteínas foram identificadas, sendo 934 com funções conhecidas ou preditas e 779 com função desconhecida. Mais da metade, (56%) das proteínas identificadas foi expressa em todos os estágios avaliados, cerca de 16% apresentavam a expressão gradativamente aumentada, 17,4% expressão gradativamente diminuídas e quase 21% não tiveram a expressão afetada.

O estudo de proteínas secretadas tem sido denominado “secretoma”, e esse tipo de estudo tem sido realizado em *Leishmania*. Secretoma de promastigotas de *L.*

donovani foi analisado utilizando marcação de aminoácidos por isótopos estáveis em cultura (*Stable isotope labeling by amino acids - SILAC*) por Silverman e colaboradores (2008). A cultura de promastigota na fase estacionária foi marcada e o sobrenadante dessa cultura foi comparado com outra cultura sem a marcação desses isótopos. Na comparação do sobrenadante dessas duas culturas, 358 proteínas foram encontradas, porém através da marcação realizada, 151 foram confirmadas como sendo secretadas pelo parasito. De acordo com o autor, a maior parte dos genes dessas proteínas não possuía o código de sinalização para serem secretadas, propondo então a secreção via vesículas (Exossomos). Cuervo e colaboradores (2009) identificaram proteínas secretadas de promastigotas de *L. braziliensis*. O sobrenadante das culturas foi retirado, precipitado e as proteínas submetidas à eletroforese bidimensional. Provenientes de 35 genes, 42 proteínas foram identificadas e submetidas à análises de bioinformática para determinar a ausência ou presença de peptídeo sinal ou vias de secreção. Duas proteínas foram preditas como sendo secretadas pela via clássica e 22 proteínas através da via não-clássica. Os autores concluem que há uma via de secreção não-convencional em *Leishmania*.

Atualmente uma importante utilização da análise proteômica tem sido a possibilidade de determinar modificações pós-traducionais, uma vez que estas são determinantes na funcionalidade protéica. Morales *et al*, 2008, realizaram o primeiro fosfoproteoma de *L. donovani* nas formas promastigotas e amastigotas axênicas. As fosfoproteínas foram imobilizadas em uma cromatografia de afinidade (IMAC) e separadas por eletroforese bidimensional. Um total de 73 fosfoproteínas foram identificadas, dentre elas, 55 com função já descrita e 18 proteínas hipotéticas. Houve mais proteínas fosforiladas na forma amastigota axênica (4%) do que em promastigotas (2.6%). Os sítios de fosforilação em *Leishmania* são sempre menos conservados em comparações a outros Trypanosomatídeos. Em relação à esses sítios de fosforilação, *L. infantum* é mais semelhante ao *Trypanosoma cruzi* do que *T. brucei* e *T. vivax*, podendo ser reflexo da relevância desses sítios para a sobrevivência/adaptação intracelular.

Virulência é definida por Chang e colaboradores (2003) como sendo o grau de patogenicidade de um micro-organismo geneticamente dotado dessa capacidade, quando se manifesta contra um hospedeiro com um sistema imune intacto sob condições normais. Embora virulência seja uma característica do parasito, ela pode ser determinada por múltiplas interações entre o parasito e o hospedeiro. Nas duas últimas

décadas, um grande número de potenciais fatores de virulência em *Leishmania* tem sido descritos. Algumas das funções atribuídas a esses fatores de virulência são ligação, migração e liberação do parasito no intestino médio dos flebotomíneos, e nos hospedeiros vertebrados, o parasito modula a atividade imunológica, levando ao estabelecimento da sobrevivência intracelular, permitindo sua multiplicação e consequente evolução da infecção e patogênese da doença.

Na literatura, observa-se o registro de diversas moléculas nas diferentes espécies de *Leishmania* causadoras de LV associadas à interação, sobrevivência e virulência na célula hospedeira. Uma delas é a proteína *Major Surface Protease* (MSP) também chamada gp63, expressa na superfície do parasito, uma metaloproteinase contendo zinco, que é encontrada em níveis aumentados em parasitos virulentos de *L. (L.) infantum* (Brittingham *et al*, 2001). A gp63 também possui função de evadir as promastigotas do sistema do complemento, além de degradar algumas enzimas citolíticas do hospedeiro, permitindo a sobrevivência das amastigotas (Hsiao, 2008).

Outra molécula expressa abundantemente na superfície de promastigotas, e uma das mais estudadas é o Lipofosfoglicano (LPG) e está envolvido em várias etapas no estabelecimento da infecção, como resistência à lise pelo complemento, ligação e entrada no macrófago, resistência às ações de antioxidantes e enzimas do hospedeiro (Späth, 2003). Quando há a diferenciação em amastigotas, os níveis de LPG são reduzidos e sua estrutura bioquímica sofre alterações (Matlashewski, 2001).

Uma proteína que têm se mostrado essencial na visceralização de *L. donovani* é a proteína A2, predominante nas formas amastigotas do parasito. Essa proteína está intimamente ligada com o nível de HSP100 nas amastigotas, sugerindo que ambas as proteínas estão envolvidas com a sobrevivência do parasito em altas temperaturas no interior do corpo do hospedeiro, ao contrário da temperatura encontrada na pele (Matlashewski, 2001; Chang *et al*, 2002).

Outras proteínas, como Triparedoxina peroxidase, S-adenosil Homocisteína Hidrolase e Tripanotiona Redutase foram também descritas como fatores de virulência e possíveis alvos para drogas (Mottram *et al*, 1998; Heikkila *et al*, 2006; Walker *et al*, 2006; Cuervo *et al*, 2010). Outros fatores relacionados à virulência do parasito já descritas, são as moléculas HSP70, HSP100, EF-1 β , e KMP11 (Achour, 2002; Chang *et al*; 2008; Cuervo *et al*; 2010).

Diante do exposto, podemos perceber que muitos dos fatores envolvidos na virulência do parasito são moléculas protéicas, o que faz das proteínas potentes candidatas ao estudo dessa relação. Logo, os diferentes níveis de expressão de algumas proteínas responsáveis pela sobrevivência de *Leishmania* spp. podem determinar o grau de virulência e patogenicidade do parasito (Yao *et al*, 2007). Assim, na busca por proteínas envolvidas com a virulência, o uso de técnicas proteômicas é especialmente importante, uma vez que os Trypanosomatídeos apresentam alta taxa de regulação pós-transcricional da expressão gênica. Além disso, essa técnica nos permite identificar pequenas diferenças na expressão de proteínas e o conhecimento das modificações pós-traducionais, as quais têm papel relevante na modulação das funções protéicas e na regulação da resposta imune na Leishmaniose.

No presente estudo, foi realizada uma caracterização da virulência *in vitro e in vivo* das cepas BH46 (menos virulenta) e BH400 (mais virulenta) de *Leishmania infantum*, em seguida uma análise Proteômica através de Gel de Eletroforese Diferencial (DIGE) e Espectrometria de Massas MALDI ToF/ToF, para avaliar as proteínas diferencialmente expressas entre promastigotas das duas cepas, com intuito de identificar fatores de virulência.

2. JUSTIFICATIVA

Em todas as formas clínicas das Leishmanioses, as variações sugerem a existência de fatores do hospedeiro e do parasito para a determinação da forma clínica, e sabe-se que fatores do parasito são determinantes na virulência. Poucos estudos foram realizados para identificação de fatores de virulência em *L. (L.) infantum* (*L. (L.) chagasi*), e em nenhum foi ainda utilizada a abordagem proteômica, sendo uma das formas mais interessantes e promissoras para isso.

O grupo de pesquisa em Leishmaniose, liderado pela Profa. Dra. Maria Norma Melo, do departamento de Parasitologia ICB/UFMG há mais de 40 anos isolou uma cepa de *L. infantum* a partir de um caso de LV humano (MHOM/BR/1972/**BH46**) e posteriormente isolou uma segunda cepa, a MCAN/BR/2000/**BH400**, de um caso de LV canino. Ambas as cepas infectam bem hamsters e cães, porém, foi observado que a BH400 é capaz de causar morbidade e mortalidade muito mais rápidas nos animais do que o isolado anterior (M. N. Melo – comunicação pessoal). No entanto, nenhuma caracterização sistemática havia sido realizada para essas cepas.

Devido a isso, o trabalho visou a caracterização comparativa da virulência de ambas as cepas em cultura de macrófagos intraperitoneais de camundongos Balb/c e em hamsters, além de avaliar aumento e peso no baço e no fígado de animais infectados e análises histopatológicas dos mesmos. A carga parasitária também foi avaliada através de imuno-histoquímica e diluição sucessiva. Além disso, a análise comparativa do proteoma de *Leishmania* pode permitir a identificação de proteínas fatores de virulência e ajudar a compreender a interação parasito-hospedeiro e o desenvolvimento da doença. Portanto, no presente estudo propomos a caracterização da virulência *in vivo e in vitro* de ambas as cepas e a comparação dos perfis proteômicos da forma promastigota entre as cepas de *L. infantum*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar fatores de virulência em diferentes cepas de *Leishmania (L.) infantum* (= *L. (L.) chagasi*).

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar *in vivo* a virulência as cepas MCAN/BR/2000/BH400 e MHOM/BR/1972/BH46 de *L. infantum*;
- Caracterizar *in vitro* a virulência das cepas MCAN/BR/2000/BH400 e MHOM/BR/1972/BH46;
- Determinar o perfil proteômico das cepas utilizadas;
- Selecionar e identificar proteínas diferencialmente expressas que possam estar associadas com a virulência das cepas BH46 e BH400.

4. METODOLOGIA

4.1- Material Biológico

Este projeto está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) / UFMG sob o protocolo 232/2010 de 1/12/2010 (Anexo 1).

As cepas MCAN/BR/2000/**BH400** e MHOM/BR/1972/**BH46** da espécie *Leishmania infantum* utilizadas, são mantidas no Laboratório de Biologia de *Leishmania* da Profa Dra. Maria Norma Melo (Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG), criopreservadas, e também sob a forma promastigota em cultivo em meio acelular com repiques semanais e em hamsters com repiques trimestrais.

As formas promastigotas foram obtidas a partir de baço de animais infectados. Os tubos contendo os fragmentos de baço em meio bifásico *Liver Infusion Tryptose* (NN-LIT) foram mantidos em estufa biológica (BOD - FANEM) a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. Foram feitos repiques contendo 200 microlitros (μL) do cultivo em novos tubos contendo Meio Mínimo Essencial (α - MEM) (Sigma-Aldrich - USA) completo a cada 6 ou 10 dias dependendo do crescimento do parasito. Após a terceira passagem dos parasitos no meio de cultivo, eles foram transferidos para garrafas plásticas de 25mL (Sarstedt - Alemanha), com um inóculo de 1×10^6 promastigotas em 10mL de meio cultura. Posteriormente foi feita a curva de crescimento para determinar a fase logarítmica de cada cepa. As cepas BH46 e BH400 foram cultivadas em meio α -MEM completo em garrafas plásticas de 600mL (Sarstedt - Alemanha) em estufa biológica (BOD – FANEM) a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, com três replicatas de cada amostra. Os parasitos foram quantificados em câmara de *Neubauer* e coletados no final da fase logarítmica ou início da fase estacionária de crescimento, até a quinta passagem no meio de cultivo.

4.2- Caracterização da virulência *in vitro*

4.2.1- Infecção de macrófagos

Foram coletados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e distribuídos em placas de 24 poços (10^5 macrófagos/poço). Os macrófagos foram infectados com formas promastigotas (10^6 células/poço) de cada uma das cepas (BH46 e BH400) em fase estacionária de crescimento e após 50 minutos de incubação a 35 °C, os parasitos não internalizados pelos macrófagos foram removidos. As células foram cultivadas por 3 dias e fixadas com glutaraldeído 2,5% e coradas por Giemsa. O número de células infectadas e o número de parasitos/célula foram determinados através de contagem de 300 células/lâmina.

4.3- Caracterização da virulência *in vivo*

Foram infectados 12 hamsters do mesmo sexo, idade e peso com 10^5 amastigotas esplênicas de cada cepa proveniente de animais em fase crônica da infecção. Após 90 dias, foi realizada avaliação da virulência das cepas, levando-se em conta o aspecto clínico geral, presença de ascite, peso dos animais, peso do baço e do fígado. Foi realizada avaliação histopatológica do baço e do fígado e a carga parasitária avaliada pelos métodos de Imuno-histoquímica e diluições sucessivas.

4.3.1- Avaliação Histopatológica

As amostras de baço e fígado de todos os hamsters foram desidratadas, limpas, embebidas em parafina, cortadas em 4-5 μ m, e corados com hematoxilina e eosina (H e E). As amostras preparadas foram avaliadas em microscopia óptica com ampliação de 100 \times . As principais alterações histológicas foram descritas como: a) Baço: espessamento, reação inflamatória crônica e na cápsula, depleção da polpa branca, hipertrofia e hiperplasia de macrófagos da polpa vermelha (granuloma), congestão e deposição de hemossiderina na polpa vermelha. b) Fígado: doença inflamatória crônica caracterizada por um exsudato de células mononucleares na região portal e formação de granulomas intralobulares, lesões degenerativas nos hepatócitos (hidrópica e esteatose),

hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer e deposição de hemossiderina. Estas alterações foram avaliadas semi-quantitativamente, tendo em conta a extensão das alterações ao longo da secção histológica e classificadas como: 1 – sem alteração, 2 - discreto (20-30%), 3 - moderada (30-60%) e 4 - grave (> 60%).

4.3.2- Imuno-histoquímica

As lâminas desparafinizadas de 12 animais (6 em cada grupo) foram hidratadas e incubadas em peróxido de hidrogênio a 4% 30 v/v em PBS 0,01 M, pH 7,2, para bloquear a atividade de peroxidases endógenas, seguido de incubação com soro normal de cabra (diluição 1:100) para bloquear a absorção de imunoglobulina não específica aos tecidos. Um soro hiper-imune heterólogo a partir de um cão infectado naturalmente com *L. infantum* (IFAT; title 1:40), diluído 1:50 em PBS 0,01 M, foi utilizado como anticorpo primário. As lâminas foram incubadas 18-22 horas a 4 ° C em câmara úmida. Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas com biotilado cabra anti-camundongo e anti-coelho (DAKO-Link, LSAB2 Kit, Catalog # KO675-1; Carpinteria, Califórnia, EUA), lavadas em PBS novamente, em seguida, incubadas com a estreptavidina-complexo peroxidase (DAKO, LSAB2 Kit, Catalog # K0675-1, Carpinteria, Califórnia, EUA) durante 30 minutos cada, à temperatura ambiente. A reação foi desenvolvida com uma solução 0,024% diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, EUA), e peróxido de hidrogênio 0,16% 40 v/v. Por fim, as lâminas foram desidratadas, desmarcadas, contra-coradas com hematoxilina de Harris, e montadas com lamínulas. A análise quantitativa foi baseada no número de amastigotas encontradas em 20 campos através de microscópio óptico com objectiva de 40x (Tafari et al, 2004).

4.3.3- Diluição sucessiva

Os baços de todos os animais foram pesados e macerados (Ultra-turrax, IKA) em meio D-MEM, contendo 20% de SFB e 10 uL/mL de solução contendo 100 UI penicilina potássica e 10 ug/mL de sulfato de estreptomicina. O tecido foi centrifugado e o sedimento ressuspenso em 1mL de meio D-MEM. Em duplicata, foram realizadas

diluições sucessivas em placa de cultivo estéreis, de 96 poços, e incubadas (BOD-Fanem, Brasil) a 23⁰C por 7 dias. A carga parasitária foi determinada a partir da mais alta diluição na qual foi observado crescimento de promastigotas.

4.4 – Análise proteômica

4.4.1- Obtenção das proteínas

As formas promastigotas, previamente coletadas e congeladas, foram lisadas e as proteínas solubilizadas por 2h a temperatura ambiente em Tampão de Lise (Uréia 8M, Tiouréia 2M, CHAPS 4%, DTT 65mM, Tris 1M, coquetel de Inibidores de Proteases - contendo inibidores de serino proteases e cisteíno proteases 40mM (*Protease Inhibitor Mix* – GE Healthcare) em uma proporção de 500 µL para cada 10⁹ parasitos. Posteriormente, o lisado celular foi passado 10 vezes por uma agulha 26G e em seguida centrifugado a 14000 rotações por minuto (RPM) durante 20 minutos. O sobrenadante foi aliqotado e armazenado em freezer -80°C até o uso. A concentração protéica foi determinada utilizando o kit *2D QuantKit* (GE Healthcare) segundo recomendações do fabricante.

4.4.2- Eletroforese Bidimensional (2-DE)

A Eletroforese Bidimensional é uma técnica eficiente na separação de complexas misturas protéicas, levando a um aumento na resolução, uma vez que separa as proteínas, inicialmente, de acordo com o ponto isoelétrico, e em seguida, pela massa molecular.

Portanto, a eletroforese bidimensional foi dividida em duas etapas: A Primeira Dimensão, onde é feita a separação utilizando o Ponto Isoelétrico (PI); e a Segunda Dimensão, onde é feita a separação por Massa Molecular.

A focalização isoelétrica (IEF) de misturas protéicas permite a separação dessas moléculas de acordo com seu ponto isoelétrico. Para isso, foram utilizadas *strips* com 7 cm de comprimento e gradiente de pH imobilizado (IPG) de 4 até 7, (GE-Healthcare).

Após avaliar a qualidade dos perfis protéicos dos géis de 7cm, foram feitos géis com *strips* de 18cm (GE-Healthcare) para obtermos uma maior separação e resolução, para facilitar a futura excisão dos *spots* para a Espectrometria de Massa.

As *strips* de 7cm foram hidratadas com 150µg da amostra protéica, Tampão IEF (8M Uréia, 2M Tiouréia, 4% CHAPS, 0,0025% Azul de Bromofenol) e 1% anfólitos IPG *buffer* pH 4-7, em um volume total de 125µl por *strip*. As *strips* de 18cm foram hidratadas com 600 µg de proteína, Tampão IEF (8M Uréia, 2M Tiouréia, 4% CHAPS, 0,0025% Azul de Bromofenol) e 1% anfólitos IPG *buffer* pH 4-7, em um volume total de 340 µl por *strip*.

A hidratação das *strips* ocorreu em temperatura ambiente por 12 horas. Em seguida, as *strips* de 7cm contendo as amostras foram submetidas à Focalização Isoelétrica (IEF) no equipamento *Ettan™ IPGPhor™ 3* (GE-Healthcare), a 50µA/gel com as seguintes condições: 500V por 1 hora e 30 minutos; 1000V por 1 hora e 30 minutos; 5000V até acumular 4000Vh; 5000V até acumular 16000Vh e 500V por 1 hora.

As *strips* de 18cm foram focalizadas utilizando as seguintes condições: 500V por 6 horas; 1000V por 1 hora e 30 minutos; 8000V por 2 horas; 8000V até acumular 40000Vh e 500V por 1 hora.

Após a IEF, as *strips* foram equilibradas para redução e alquilação das proteínas com Tampão de Equilíbrio (50 mM de Tris 1,5M pH 8,8, 6M Uréia, 30% Glicerol, 2% Dodecil Sulfato de Sódio - SDS, 0,001% v/v Azul de Bromofenol 0,5%) contendo 10mg/mL de Ditionitrotol (DTT) por 15 minutos sob leve agitação. Essa solução foi substituída por Tampão de Equilíbrio contendo 25mg/mL de Iodoacetamida (IAA) em vez de DTT. Posteriormente, as *strips* foram lavadas rapidamente em Tampão Tris-Glicina 10% e posicionadas horizontalmente na parte superior do gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e cobertas com Agarose 0,5% contendo azul de bromofenol 0,002%.

Para a segunda dimensão, foi utilizado o aparelho de eletroforese vertical *Ettan DALTsix Electrophoresis Unit* (GE – Healthcare). A corrida dos géis foi limitada a 50V/gel e 25mA/gel nos primeiros 15 minutos, e após esse tempo, a corrente foi aumentada para 100V/gel e 50mA/gel a 10⁰C, até a completa separação por massa molecular das proteínas.

Ao término da eletroforese, os géis bidimensionais foram corados segundo (Neuroff, 1985), brevemente, os géis são colocados em solução fixadora contendo Ácido Ortofosfórico 2% e Etanol 30% por 12 horas em temperatura ambiente; em

seguida em solução contendo Ácido Ortofosfórico 2%, realizando-se 3 lavagens de 10 minutos cada e por último em solução contendo Ácido Ortofosfórico 2%; Etanol 18% e Sulfato de Amônio 12% por 30 minutos. A essa solução foi acrescentado 0,1% de *Coomassie Brilliant Blue G-250* 4% (GE – Healthcare) para a coloração das proteínas por 5 dias. Após esse período, o *background* foi removido com Etanol 20% e as imagens dos géis foram digitalizadas, utilizando-se o *scanner ImageScanner* (Amersham Biosciences).

4.4.3- Differential Gel Electrophoresis (DIGE)

Após avaliarmos a qualidade das amostras através dos géis bidimensionais, foi utilizada uma metodologia para se avaliar a expressão diferencial de proteínas das formas promastigotas nas cepas BH46 e BH400. Para isso, foi realizada a técnica Gel de Eletroforese Diferencial (*Differential Gel Electrophoresis*- DIGE).

O extrato proteico de 3 cultivos independentes de promastigotas de cada cepa foi marcado com o fluoróforo CyDye™ (GE Healthcare), conforme o delineamento experimental demonstrado na Tabela 1. A marcação das proteínas foi realizada de modo a ocorrer a inversão das amostras com diferentes fluoróforos (*Dye Swab* com Cy3 e Cy5), e para a normalização dos dados, uma mistura de todas as amostras foi marcada com o fluoróforo Cy2, sendo este o padrão interno.

Tabela 1: Esquema de marcação com CyDye dos extratos proteicos: As proteínas de promastigota das cepas foram marcadas com 3 fluoróforos CyDye (Cy2, Cy3 e Cy5), de modo a ocorrer a inversão da marcação com diferentes fluoróforos. Foi realizado um terceiro gel, réplica do GEL 1, para poder realizar análises estatísticas pelo programa - DeCyder™ 2-D *Differential Analysis Software* v7.2 (GE - Healthcare).

GEL	Cy3	Cy5	Cy2
GEL 1	Promastigota BH46	Promastigota BH400	Mix das Amostras*
GEL 2	Promastigota BH400	Promastigota BH46	Mix das Amostras*
GEL 3	Promastigota BH46	Promastigota BH400	Mix das Amostras*

*Promastigota BH46 + Promastigota BH400 marcados com Cy2.

As amostras foram mantidas a -80°C até o momento do uso. O pH das amostras foi medido e quando preciso, ajustado para 8,5 com HCl 0,5 nM ou NaOH 500 mM. Foi utilizado para a marcação 400 pmol de cada fluoróforo (Cy2, Cy3 e Cy5) em 50µg de proteína. As amostras após a marcação, foram homogeneizadas, centrifugadas rapidamente e deixadas no gelo por 30 minutos. Após esse tempo, foi acrescentado 1µl de L - Lisina 10 mM para interromper a marcação dos fluoróforos com as proteínas e foram deixadas no gelo por 10 minutos. Posteriormente, as amostras marcadas com o fluoróforo foram hidratadas em *strips* de 18cm, pH 4-7 por 12 horas. Em uma mesma strip foram colocadas amostras de cada cepa, além de uma mistura das duas cepas marcadas com o padrão interno (Cy2). A Primeira e Segunda Dimensão do gel bidimensional foi realizada conforme descrito anteriormente.

Após o término da segunda dimensão, os géis foram digitalizados no *scanner Typhoon FLA 9000* (GE-Healthcare), utilizando os seguintes parâmetros para excitação e emissão da fluorescência: Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm) e Cy5 (633/670 nm).

4.4.4- Análise *in silico* dos Géis

Foram utilizadas duas formas de análises dos géis - a primeira foi a Análise de Reprodutibilidade do Perfil Proteômico das formas Promastigotas de cada cepa. A segunda análise realizada foi a expressão diferencial de proteínas entre Promastigotas das diferentes cepas. Na primeira análise foi utilizado o *software ImageMaster 2D Platinum* v6.0 (GE - Healthcare) e na segunda análise, foi utilizado o *software: DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software* v7.2 (GE - Healthcare). Esse último programa tem como sua principal função a análise de géis fluorescentes realizados através da técnica DIGE, permitindo uma análise automatizada das imagens quanto a detecção, quantificação, sobreposição das imagens e análise estatística dos resultados.

A Análise de Reprodutibilidade do Perfil Proteômico entre as imagens de promastigotas de cada cepa foi realizado no *software ImageMaster 2D Platinum* v6.0 (GE Healthcare), avaliando-se o índice de correlação (*Scatter Plot*) da sobreposição entre as imagens e a % de *match* entre os géis.

Por outro lado, para a segunda análise realizada através do *software DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software* v7.2 (GE - Healthcare), foi montado um desenho

experimental para seleção das proteínas diferencialmente expressas entre as cepas no modo *Spot Map Mode* do programa (Figura 1).

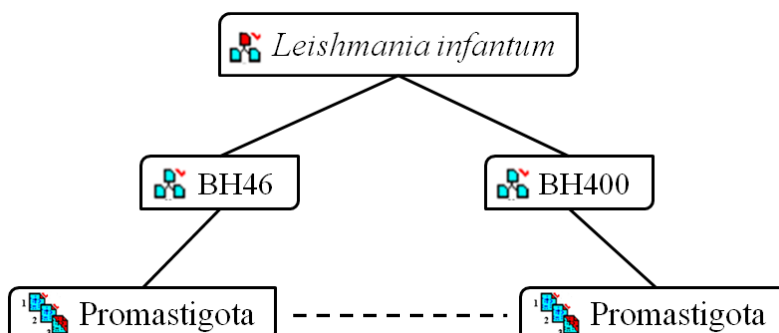


Figura 1: Representação esquemática das análises entre BH400 e BH46. Foram realizadas 2 análises das imagens: Análise de Reprodutibilidade do Perfil Proteômico entre as 3 imagens da forma evolutiva Promastigota de cada uma das cepas separadamente; e a Análise de expressão diferencial de proteínas entre Promastigotas das diferentes cepas.

O software DeCyder™ 2-D *Differential Analysis Software* v7.2 (GE - Healthcare) é dividido em 5 módulos, sendo eles o *Image Loader*, *Organizer*, *Differential in-gel Analysis (DIA)*, *Biological Variation Analysis (BVA)*, e o *Extended Data Analysis (EDA)*, conforme exemplificado na Figura 2.

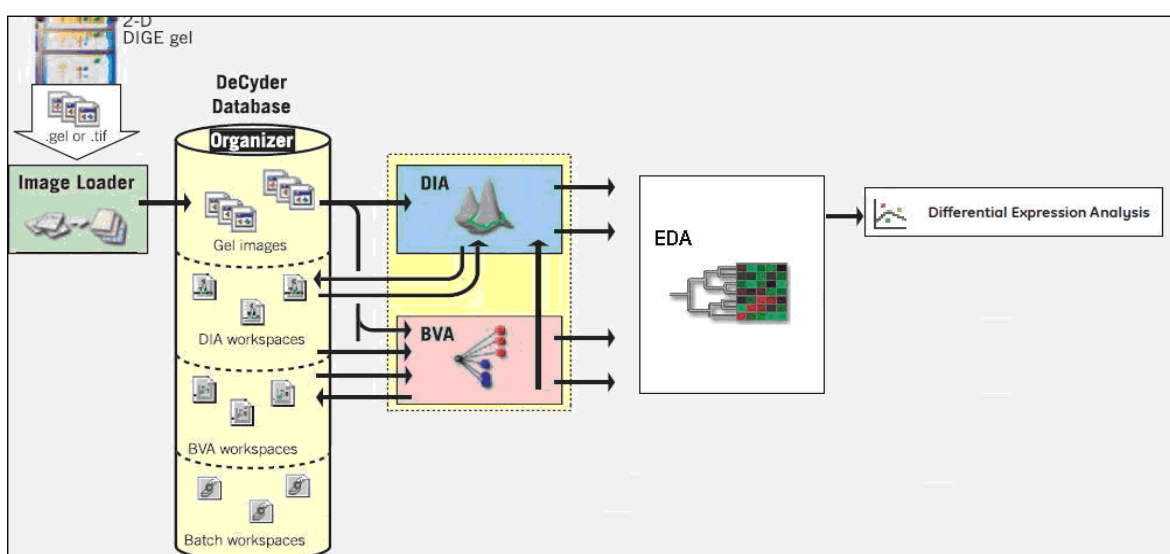


Figura 2: Esquema da análise das imagens obtidas dos géis fluorescentes utilizando o software DeCyder™ 2-D *Differential Analysis Software* v7.2 (GE Healthcare).

Após obtermos as imagens dos géis fluorescentes estas foram enviadas para o primeiro módulo do software, o *Image Loader*. Também foi ajustado o contraste e o brilho das imagens para facilitar a análise. O segundo módulo do programa, o *Organizer* permitiu agrupar as 3 imagens dos diferentes fluoróforos em cada gel. No módulo DIA, os *spots* marcados com os diferentes fluoróforos foram detectados e quantificados. A detecção desses *spots* foi delimitada de acordo com os parâmetros escolhidos, sendo eles: inclinação (*Slope*), volume, área e o tamanho do pico, conforme exemplificado na Figura 3.

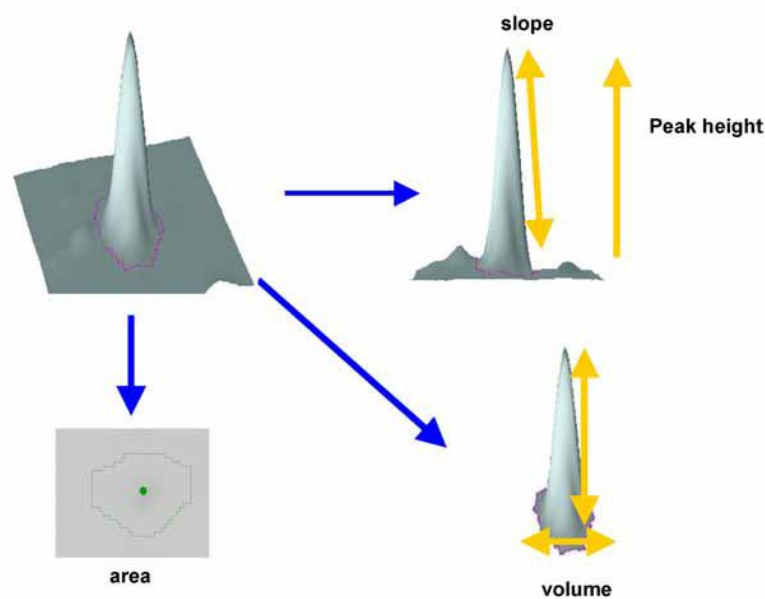


Figura 3: Definição dos parâmetros utilizados na seleção dos *spots*. **Área:** área expressa em pixels dentro de um *spot* delimitado. **Inclinação (*Slope*):** Medida dos atributos tridimensionais do *spot*.

Foi observado que artefatos que não eram *spots* possuíam um valor de Inclinação elevado, e Área pequena. Portanto, os parâmetros utilizados para se chegar a uma detecção satisfatória, eliminando diversos artefatos foram: Inclinação $\geq 0,87$; Área ≤ 350 .

Após a detecção dos *spots* através dos parâmetros utilizados, existe a necessidade de realizar uma edição manual, para a deleção de artefatos que possam ter sido erroneamente detectados através dos parâmetros utilizados. Portanto, após essa etapa minuciosa de edição, foi avaliada a qualidade da reprodutibilidade dentre as 3 imagens de cada amostra.

As imagens foram exportadas para o segundo módulo do *software* denominado *Biological Variation Analysis* (BVA). O BVA possui 4 diferentes modos de visualização e trabalho. O primeiro modo, denominado *Spot Map Mode* é o lugar onde se organiza o *design* experimental, o qual será necessário mais tarde para a análise estatística. O segundo modo, *Match Mode* é uma análise comparativa de sobreposição entre as imagens dos géis. Portanto, as três imagens de uma mesma amostra marcada com Cy3 e Cy5 são agrupadas e comparadas através de sobreposição com as outras 3 imagens da outra amostra que também estão agrupadas.

O modo *Protein Mode*, é utilizado para demonstração de vários dados de cada *spot*, tais como: Razão Média, Ponto Isoelétrico, Massa Molecular, além de dados estatísticos como o *Test T Student*, One-Way ANOVA e Two-Way ANOVA. Através desses dados, pode-se filtrar e selecionar apenas *spots* estatisticamente significativos.

O último modo é denominado *Appearance Mode* e é utilizado para obter dados estatísticos de apenas *spots* individuais, não o correlacionando com os outros *spots* do gel.

Para seleção das proteínas diferencialmente expressas, foi realizada a sobreposição das imagens (*match*) entre Promastigotas da cepa BH46 e Promastigotas da cepa BH400 no modo *Match Mode*. Após a sobreposição, foi realizada uma avaliação da qualidade do *match* em uma escala de 0 a 15, onde quanto menor o valor, mais confiável a sobreposição.

Após uma revisão e edição minuciosa para averiguar e corrigir a qualidade do *match*, no *Protein Mode* os *spots* foram submetidos ao teste *T-student* e ao *One-Way ANOVA* e todos aqueles com o $P \leq 0,05$ foram selecionados como sendo diferencialmente expressos.

Esses *spots* foram exportados para o módulo *Extended Data Analysis* (EDA), que é utilizado para análises multivariáveis de expressão de proteínas provenientes do módulo BVA, sendo capaz de analisar dados de até 1000 géis simultaneamente. Além de avaliar dados univariáveis, como *Test T Student* e também análise de variância *One-Way ANOVA*, também foi realizada uma Análise de Padrões (*Pattern Analysis*), reconhecendo padrões nas expressões de proteínas.

Os *spots* com diferenças na expressão estatisticamente significativos foram selecionados e excisados dos géis para a identificação por espectrometria de massa MALDI-ToF/ToF.

4.4.5- Espectrometria de Massa (MS)

Para a identificação dos *spots* selecionados, os mesmos foram excisados dos géis e descorados através de três lavagens de 15 minutos cada com 400 µL de uma solução de Acetonitrila 50% e Bicarbonato de Amônio 25 mM, pH 8,0 sob constante agitação. A solução descorante foi removida, em seguida os *spots* foram desidratados com 200 µL de Acetonitrila P.A. durante 5 minutos. Após secagem, foi adicionado 10 µl de Tripsina (Promega, USA) 20 ng/µL e 20µl de Bicarbonato de Amônio 50mM para a digestão enzimática das proteínas, no gelo. As amostras foram deixadas a 37 °C por 16-24 horas para a completa digestão e fragmentação das proteínas. As soluções contendo Tripsina e Bicarbonato de Amônio foram coletadas e transferidas para tubos novos, e ao tubo anterior, contendo os fragmentos de géis, foi adicionada uma solução de Ácido Fórmico 5% e Acetonitrila 50% e deixado por 30 minutos sobre constante agitação. Após esse tempo a solução foi removida e transferida para o tubo contendo a primeira solução retirada. O procedimento anterior com Ácido Fórmico 5% e Acetonitrila 50% sob constante agitação foi repetido e essa solução também foi transferida para o tubo contendo os outros extratos. Os tubos contendo todos os extratos foram concentrados utilizando o aparelho *Concentrator Plus*[®] (Eppendorf, USA) até o volume final de 10 µL.

Os extratos foram passados em colunas *ZipTip*[®]C18 (Millipore, USA) para dessalinização e concentração dos peptídeos. Aproximadamente 0,5 µL da amostra concentrada foi misturada com 0,25 mL de uma solução saturada de matriz [10 mg/mL α-ciano-4-hidroxicinâmico (Aldrich, Milwaukee, WI), em 50% acetonitrila/0.1% de ácido trifluoroacético]. As amostras foram aplicadas na placa *MTP AnchorChip*[™] 600/384 (Bruker Daltonics) e deixadas secando em temperatura ambiente. Os dados brutos para a identificação das proteínas foram obtidos no MALDI-TOF/TOF Autoflex III[™] (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) com o instrumento no modo positivo/refletor controlado pelo software *FlexControl*[™]. A calibração do instrumento foi realizada através da utilização de péptidos de calibração padrão II (Bruker Daltonics) como referência. Picos de contaminação de tripsina e queratina foram excluídos da lista utilizada na pesquisa em banco de dados. Cada espectro foi produzido pela acumulação de dados a partir de 200 disparos consecutivos do laser.

Os dados obtidos foram armazenados e levados para o *software Bruker Daltonics BioTools 3.2™*, onde foi realizada a pesquisa no banco de dados MASCOT (Matrix Science, USA – <http://www.matrixscience.com>). Apenas proteínas com valores de *score* $P \leq 0,05$ foram levados em consideração na identificação.

4.5- Organização dos dados proteômicos

Primeiramente, foi realizada uma categorização funcional entre as proteínas identificadas pelo MALDI através das anotações sobre processos biológicos e funções moleculares para as proteínas de *L. infantum* depositadas no banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e confirmadas através do banco de dados Gene Ontology (GO) - (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/search.cgi>).

O número do GO de cada proteína foi submetido ao catálogo FunCat - Functional Catalogue (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/>), onde as proteínas foram classificadas funcionalmente.

Além da classificação funcional, também foi realizada uma pesquisa de predição de interação das proteínas identificadas com proteínas existentes, através do banco de dados String 9.0 (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* - <http://string-db.org>), que fornece uma rede de interações preditas ou já descritas na literatura entre proteínas ou entre genes. As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais), que são derivadas de quatro fontes: contexto genômico, experimental (*High-throughput*), co-expressão (conservado) e conhecimentos prévios.

5 RESULTADOS

5.1 Material Biológico

Uma curva de crescimento foi determinada para cada cepa utilizada, para que os parasitos fossem coletados no final da fase logarítmica/início da fase estacionária de crescimento até a quinta passagem no meio de cultivo, ou seja, em torno de 7 dias conforme a Figura 4.

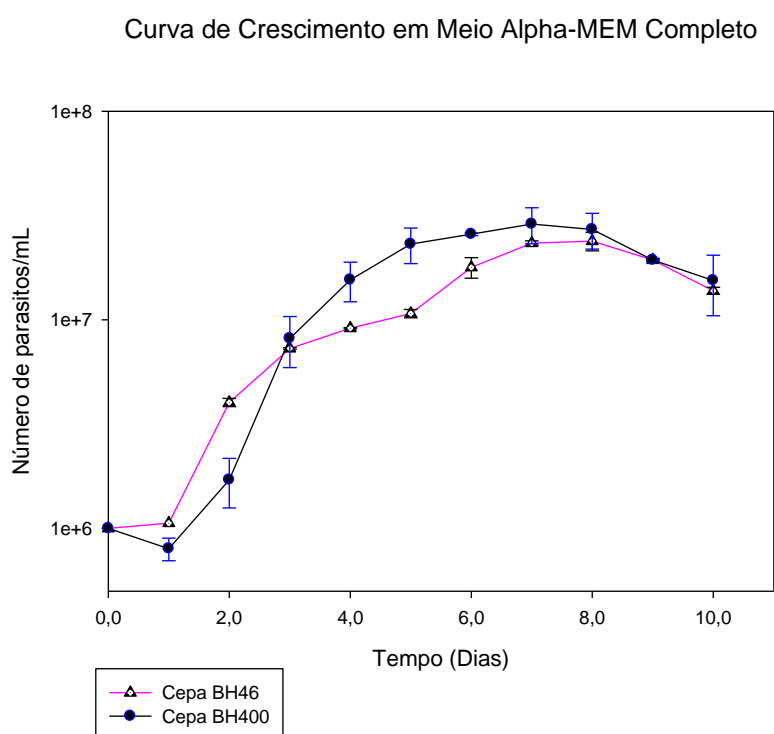


Figura 4: Curva de crescimento de *L. infantum* na forma Promastigota em meio α -MEM completo.

5.2- Caracterização da virulência *in vitro*

Foram observados cerca de 5% e 12% de macrófagos intraperitoneais de camundongos Balb/c infectados com a cepa BH46 e BH400, respectivamente. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0.0042$) (Figura 5A), mostrando que a cepa BH400 foi capaz de invadir um maior número de células hospedeiras em relação a

cepa BH46. Também podemos observar uma maior relação de parasitos/célula nos ensaios com BH400 (2,5 parasitos/célula) em relação a BH46 (1,8 parasitos/célula). No entanto, esta diferença não se mostrou significativa ($p = 0.0776$), provavelmente devido ao curto tempo de cultivo das células (3 dias) (Figura 5B).

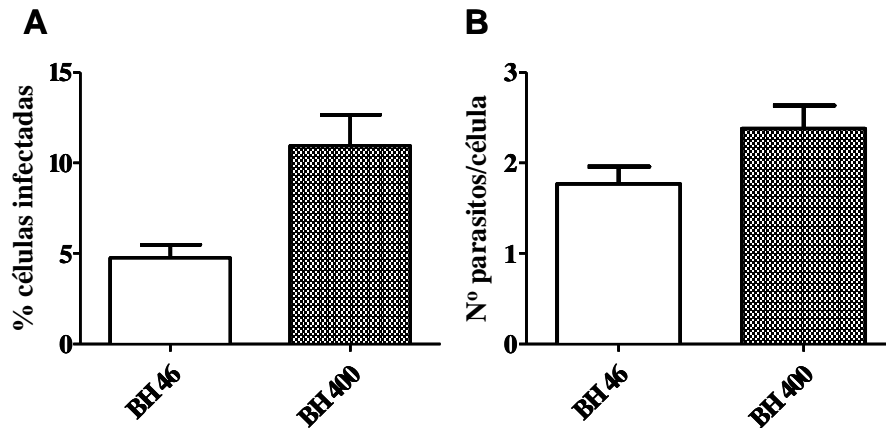


Figura 5: Avaliação da virulência *in vitro* das cepas BH46 e BH400 de *L. infantum*. Macrófagos (10^5) foram infectados com promastigotas (10^6) de cada cepa e após 3 dias as células foram coradas pelo Giemsa. A porcentagem de células infectadas (A) e o número de parasitos/célula (B) foram determinados com a média das triplicatas.

5.3- Caracterização da virulência *in vivo*

Noventa dias após a infecção dos 12 hamsters (6 hamsters para cada cepa), os animais foram sacrificados e foi observado uma maior frequência de ascite, edema e aumento no peso dos animais infectados com BH400, em relação aos infectados com BH46 (figura 6A). Também houve aumento no peso dos baços e fígados de animais infectados com BH400 (figuras 6B e 6C). Diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos pesos dos baços ($p=0,0013$).

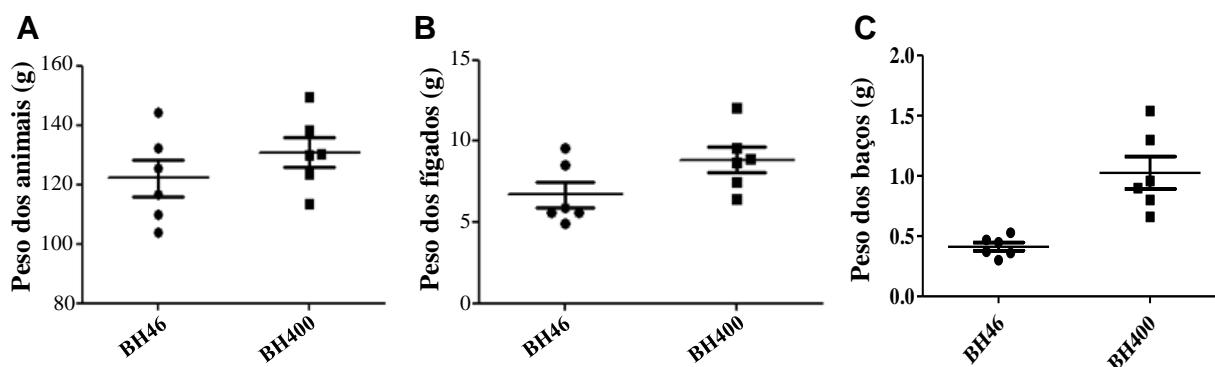


Figura 6: Avaliação da virulência *in vivo* das cepas BH46 e BH400 de *L. infantum*. Grupos de 6 hamsters foram infectados com 10^5 amastigotas de cada cepa separadamente. Foram avaliados os pesos dos animais infectados (A), dos fígados (B), dos baços (C).

5.3.1 Avaliação Histopatológica

Os fragmentos de fígado dos animais infectados pela cepa BH400 apresentaram uma inflamação granulomatosa no espaço-porta e no interior dos lóbulos hepáticos (granulomas intralobulares). Os hepatócitos apresentaram degeneração hidrópica e/ou esteatose variando de discreta a intensa. Em geral, foi observado espessamento da cápsula reativa ao processo crônica granulomatosa. Por outro lado, os tecidos da maioria dos animais infectados pela cepa BH46 apresentaram histologia sem alterações. Os hepatócitos apresentaram degeneração hidrópica variando de discreta a intensa (Figura 7A e 7B). Foi observada diferença significativa nas alterações dos granulomas, inflamação portal, e espessamento da cápsula ($p < 0,002$). Os animais infectados pela cepa BH46 apresentaram um menor parasitismo tecidual comparado aos animais infectados pela cepa BH 400 ($p=0,0001$) (Figura 7C).

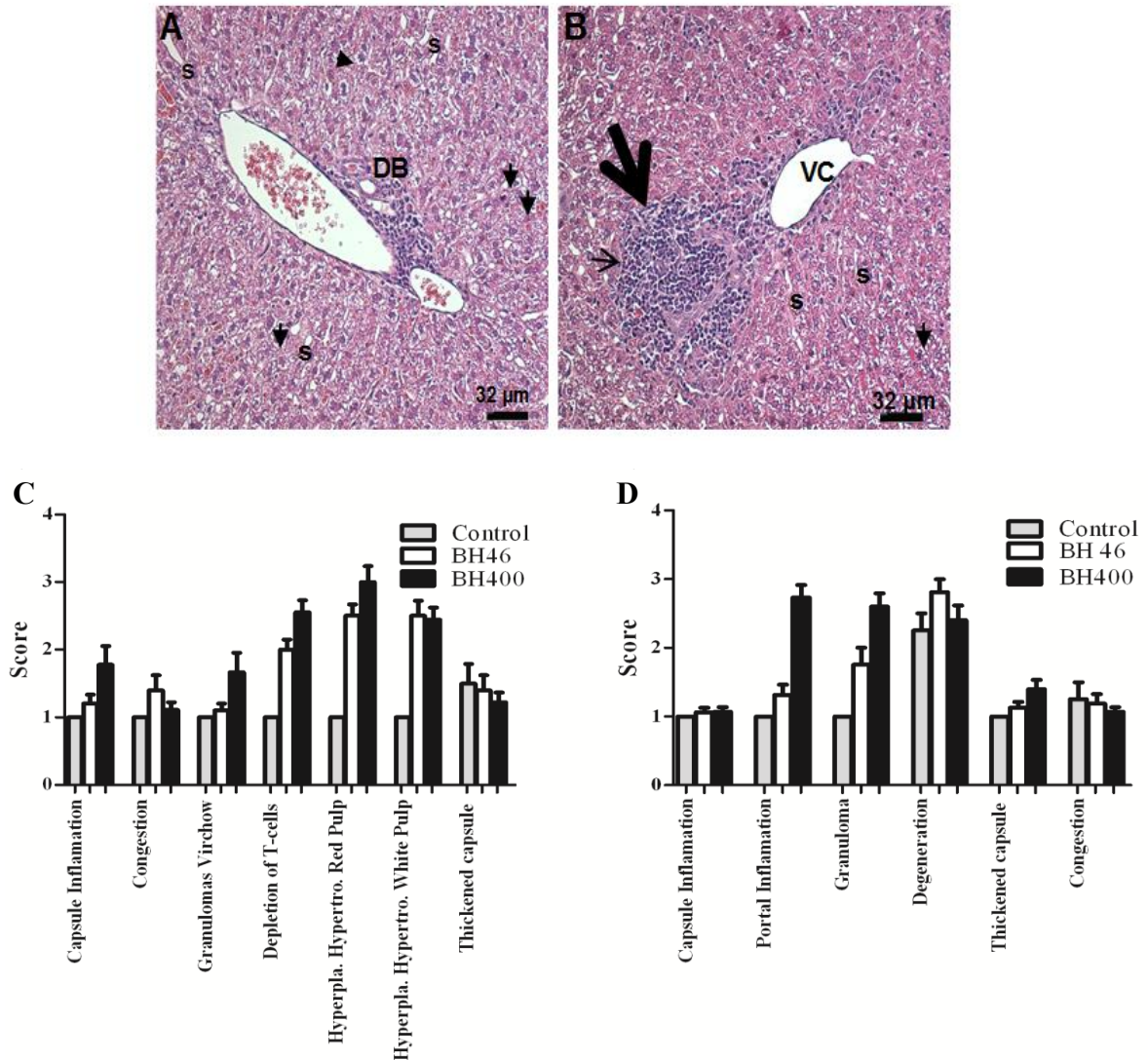


Figura 7: HE dos fígados de animais infectados com BH46 e BH400. Cortes histológicos de fígados infectados com BH46 (A) e BH400 (B). Seta grande – granuloma intralobular; macrófagos (células epitelióides) – cabeça da seta; Plasmócitos e linfócitos – setas finas. DB- ducto biliar; VC- veia centro lobular; S- sinusóide. (C) Histopatologia do baço e (D) Histopatologia do fígado. A Análise Histopatológica foi realizada considerando a extensão da lesão e as amostras foram classificadas com índices de intensidade das alterações: 1 – sem alteração; 2 – discreto; 3 – moderado e 4-intenso.

5.3.2- Imuno-histoquímica

A avaliação do parasitismo tecidual realizada pela imuno-histoquímica no fígado dos animais está apresentada na Figura 8A e 8B. Os animais infectados pela cepa BH400 apresentaram um parasitismo tecidual elevado comparado aos animais infectados pela cepa BH 46 (Figura 8C).

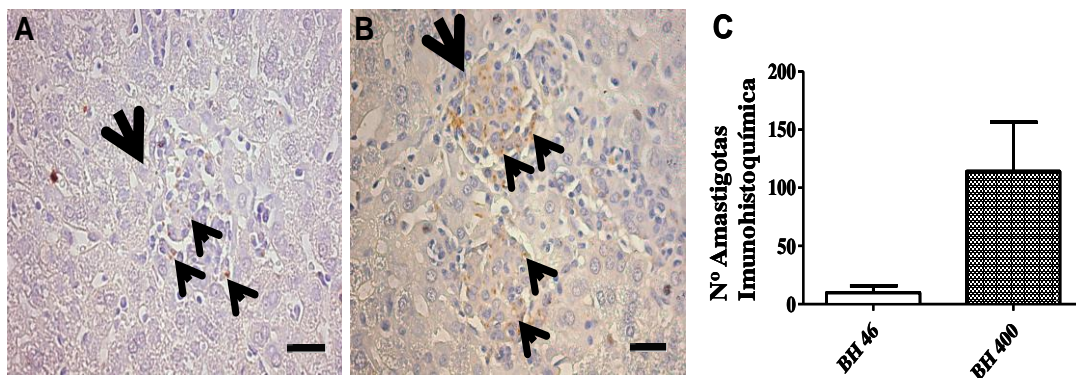


Figura 8: Imunohistoquímica dos fígados de animais infectados com BH46 e BH400. Cortes de fígado de animais infectados com BH46 (A) e BH400 (B). Seta grande – granuloma intralobular; macrófagos (células epitelióides) – cabeça da seta. Foi determinado o número de amastigotas nos órgãos infectados (C).

5.3.3- Diluição Sucessiva

Na quantificação da carga parasitária por diluição sucessiva dos baços de animais infectados, podemos observar que para a cepa BH400, foi verificado o crescimento dos parasitos até a diluição 10^7 , enquanto para a cepa BH46 houve crescimento até o fator de 10^2 (Figura 9). Diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos pesos dos baços ($p=0,0013$) e na quantificação da carga parasitária ($p < 0,0001$).

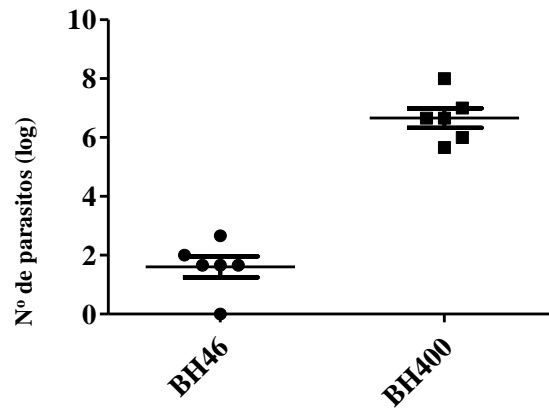


Figura 9: Quantificação da carga parasitária por diluição seriada dos baços de animais infectados com as cepas BH46 e BH400.

5.4 Análise Proteômica

Os géis de 7cm confeccionados para obtenção do perfil proteômico de promastigotas das duas cepas foram corados por *Coomassie Brilliant Blue G-250* e representaram uma boa separação das proteínas, tanto na Focalização Isoelétrica (primeira dimensão) quanto na separação por massa molecular (segunda dimensão) (Figura 10). Posteriormente à digitalização dos géis, as imagens foram exportadas para o *software ImageMaster 2D Platinum 6.0* (GE Healthcare) para a detecção e quantificação dos *spots*. Após uma edição para a eliminação de artefatos, foram detectados 782 *spots* no gel de promastigota da cepa BH46 e 761 *spots* no gel de promastigota da cepa BH400.

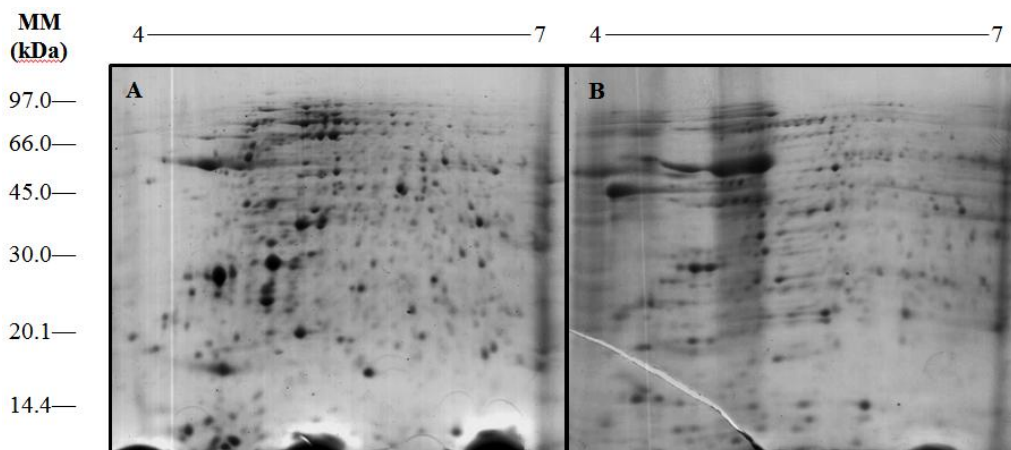


Figura 10: Géis Bidimensionais SDS-PAGE a 12% corados por *Coomassie Brilliant Blue G-250*, de *strips* de 7 cm de comprimento, de pH 4-7 com 150 μ g de proteínas de promastigotas. (A) cepa BH46 com 782 *spots* detectados e (B) cepa BH400 com 761 *spots* detectados.

Devido a esse resultado, as amostras utilizadas foram submetidas ao próximo procedimento, utilizando-se géis bidimensionais com *strips* de 18cm para aumentar a resolução e separação das amostras, e também facilitar a excisão dos *spots* após a análise de bioinformática.

A Figura 11 representa os géis bidimensionais de 18cm de promastigotas de cada cepa de *L. infantum*. Observa-se que houve uma boa separação das proteínas através do Ponto Isoelétrico (primeira dimensão), com os *spots* migrando até o final da lateral direita dos géis (final da *strip*), não havendo arrastes e conjunto de *spots* agrupados. A separação por massa molecular também foi satisfatória, com os *spots* migrando até o final inferior do gel.

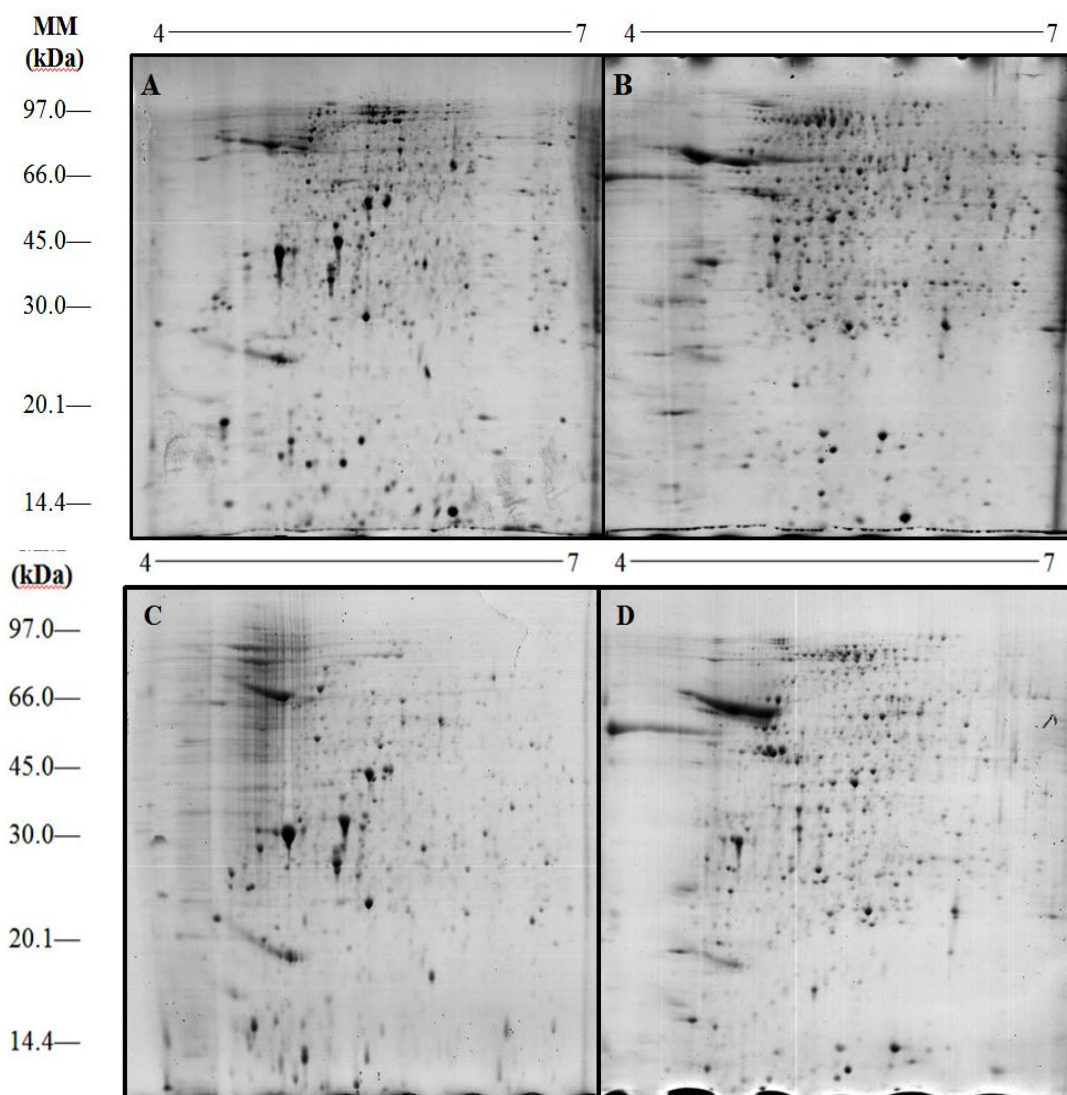


Figura 11: Géis Bidimensionais SDS-PAGE a 12% corados por *Coomassie Brilliant Blue G-250*, de *strips* de 18 cm de comprimento, de pH 4-7 com 600 μ g de proteínas de promastigotas das cepas: BH46 (A e C) e BH400 (B e D).

Após uma edição do resultado obtido pela detecção para a eliminação de artefatos, foram detectados uma média de 1130 *spots*/gel de promastigota da cepa BH46 e 920 *spots*/gel de promastigota da cepa BH400.

Esses géis foram utilizados para Análise de Reprodutibilidade do Perfil Proteômico realizada por meio do programa *ImageMaster 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare), Entre os diferentes géis de uma mesma cepa foi obtido um índice de Correlação de 0,87 para a Cepa BH46 e 0,96 para a cepa BH400 e uma quantidade de *match* de 857 e 682, respectivamente. Os perfis protéicos de promastigotas da cepa BH46 e BH400 (Figura 12) apresentaram boa reprodutibilidade, principalmente em

relação ao número total de *spots*, intensidade e distribuição dos *spots* no gel, conforme indicado através do índice de correlação, nos quais valores próximos a 1 significam uma boa correlação entre as posições relativas dos *spots* nos géis (Figura 13).

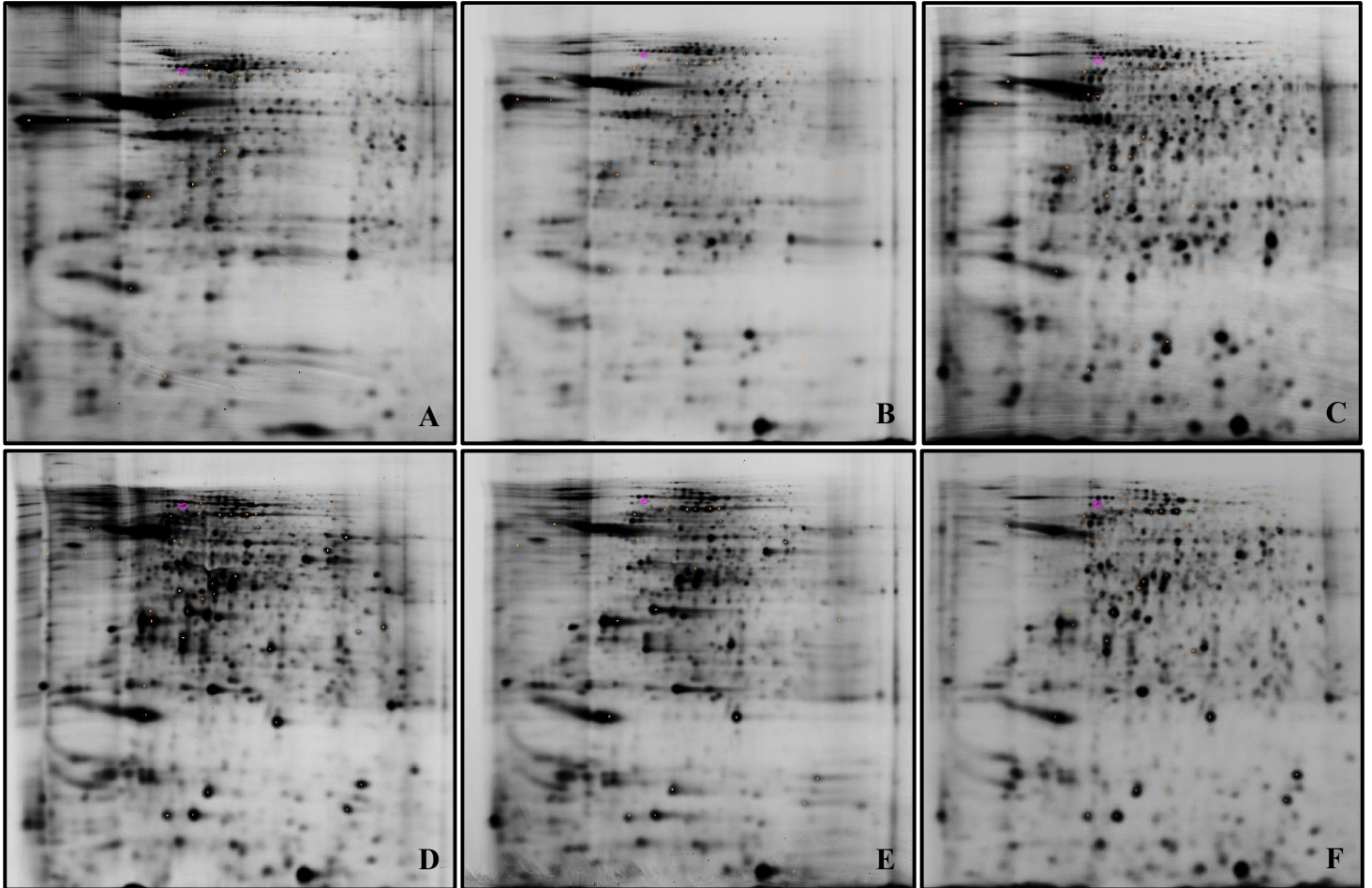


Figura 12: Géis Bidimensionais SDS-PAGE a 12%, *strips* de 18 cm pH 4-7 demonstrando o Perfil Proteômico entre as imagens de promastigota da cepa BH400 (Imagens A, B e C) e da cepa BH46 (Imagens D, E e F) com alta reprodutibilidade.

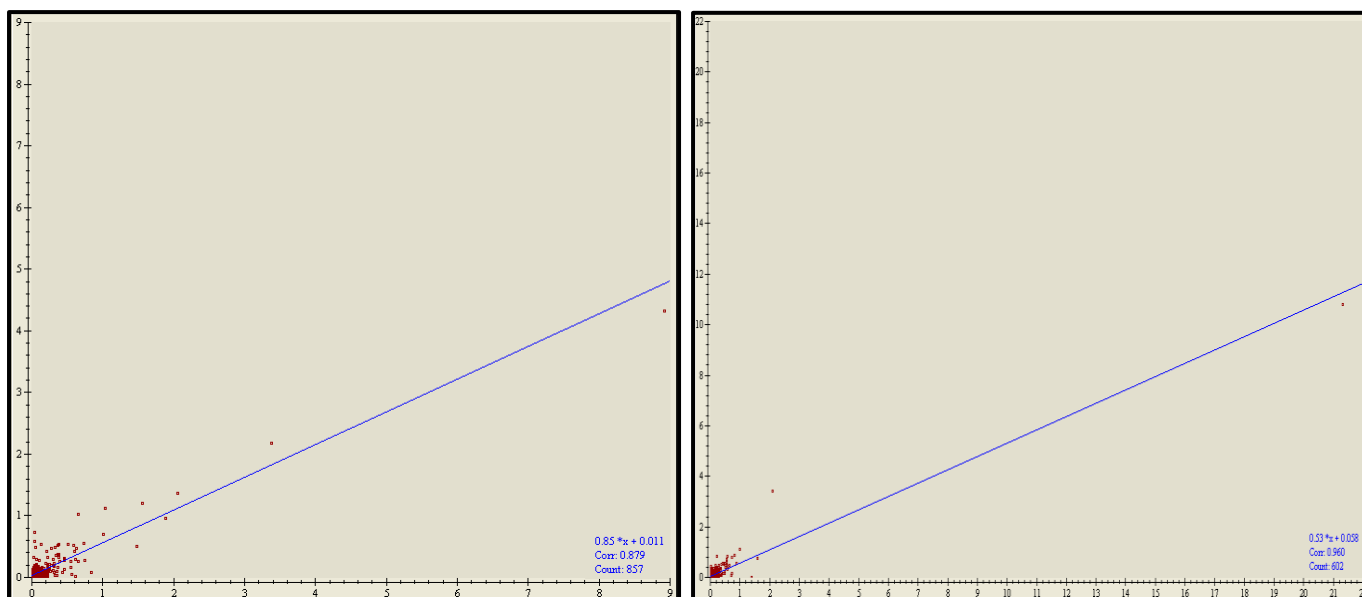


Figura 13: *Scatter Plot* representando (eixo X) a relação entre os valores de % de volume de cada *spot* com os valores (eixo Y) de % de volume do gel usado como referência para a comparação. Corr: Índice de Correlação; Count: Quantidade de *match* entre os géis.

O resultado obtido dos géis bidimensionais de 7cm e 18cm de promastigotas de ambas as cepas utilizadas (BH46 e BH400) demonstraram uma qualidade satisfatória, com um perfil de proteínas bem distribuídas, sendo viáveis para prosseguirmos com a avaliação de proteínas diferencialmente expressas entre as cepas através da técnica DIGE.

5.4.2 Differential Gel Electrophoresis (DIGE)

Foi realizada a digitalização dos géis fluorescentes no aparelho *Typhoon FLA 9000* (GE-Healthcare). Os géis fluorescentes do extrato protéico de *L. infantum* na forma promastigota da cepa BH46 e da cepa BH400 estão demonstrados na Figura 14.

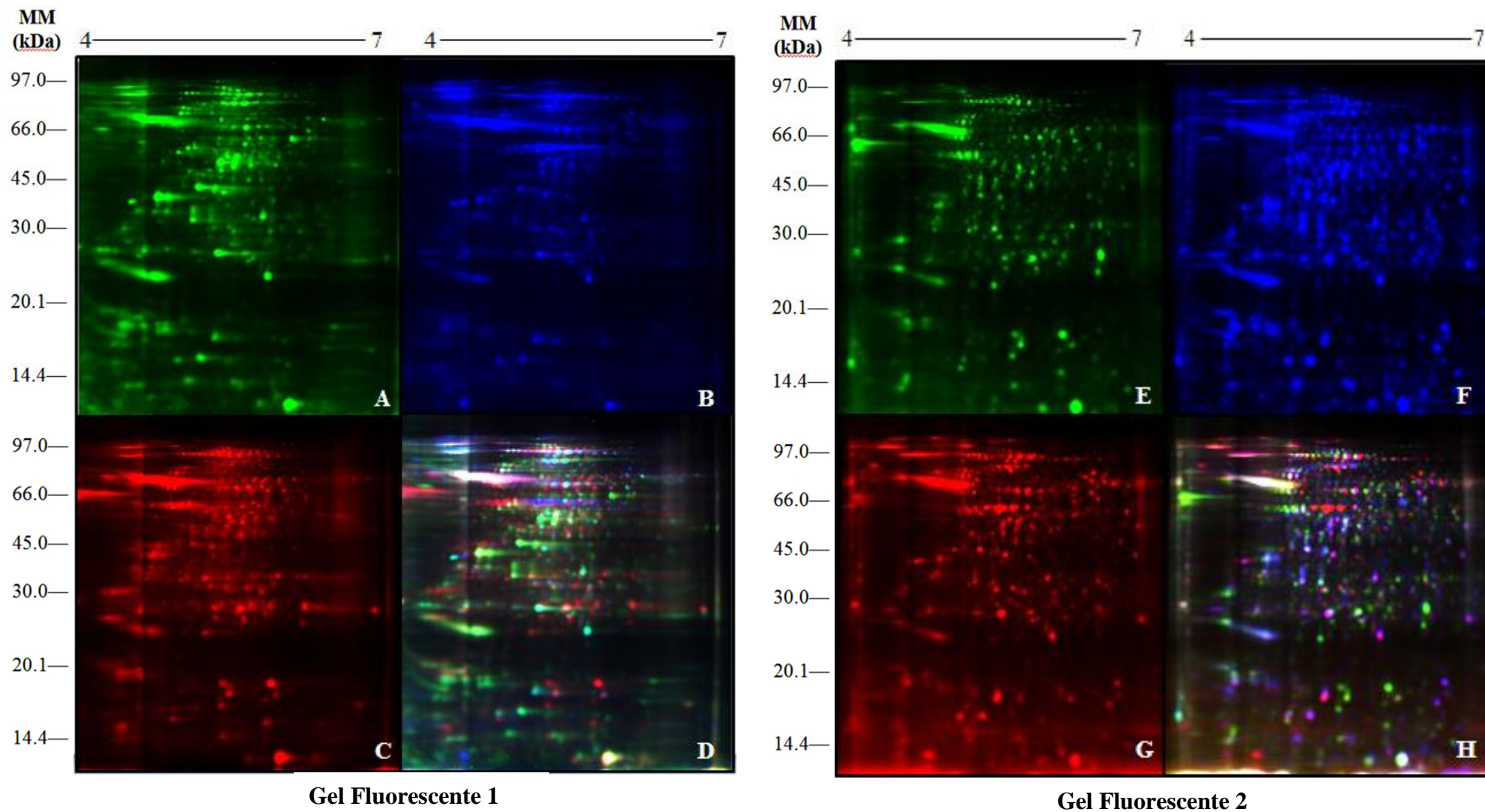


Figura 14: Géis Bidimensionais Fluorescentes de promastigotas de *L. infantum* das cepas BH46 e BH400, em *strips* de 18cm pH 4 – 7 contendo 50 μ g de proteína de cada amostra. A – Mix das amostras marcadas com Cy2 utilizado para a normalização, sendo o controle interno da reação; B – Promastigota da cepa BH46 marcado com Cy3; C – Promastigota da cepa BH400 marcado com Cy5; D – Sobreposição das 3 imagens (Cy2, Cy3 e Cy5) do Gel fluorescente 1; E – Mix das amostras marcadas com Cy2 utilizado para a normalização, sendo o controle interno da reação; F – Promastigota da cepa BH400 marcado com Cy3; G – Promastigota da cepa BH46 marcado com Cy5; H – Sobreposição das 3 imagens (Cy2, Cy3 e Cy5) do Gel fluorescente 2.

Os géis DIGE foram analisados utilizando o *software DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.2* (GE - Healthcare) Inicialmente, no módulo DIA os *spots* foram detectados e quantificados de acordo com os parâmetros citados anteriormente. A princípio foram detectados cerca de 2300 *spots*/gel, porém, após delimitarmos os parâmetros para refinar a detecção e utilizar filtros de exclusão para eliminar artefatos, o número de *spots*/gel foi 1377 para o Gel Fluorescente 1, 1100 para o Gel Fluorescente 2 e 1055 para o Gel Fluorescente 3.

Após a detecção dos *spots* e uma minuciosa edição para confirmar a qualidade da detecção realizada pelo *software*, foi feito o *match* entre os géis para que houvesse sobreposição dos *spots* em comum entre cada imagem. Foi obtido um *match* com valores acima de 80%, índice considerado aceitável de acordo com Görg *et al*, (2007) entre as imagens de Promastigota das cepas BH46 e BH400. Os *spots* foram sobrepostos e foi avaliada a diferença de expressão entre as cepas através dos testes estatísticos *T Student* e *One-Way ANOVA* ($P \leq 0,05$) (Figura 15).

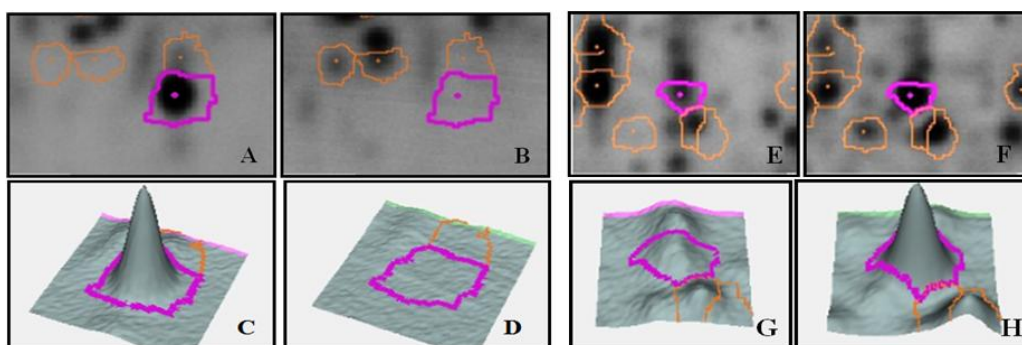


Figura 15: Imagem representativa da diferença de expressão entre um *spot* da cepa BH46 (A) e a demonstração tridimensional do *spot* (C) em relação ao mesmo *spot* da cepa BH400 (B) e sua demonstração tridimensional (D). *Spot* da cepa BH400 (F) é mais expresso quando comparado ao mesmo *spot* da cepa BH46 (E) e sua demonstração tridimensional (G).

No módulo *Extended Data Analysis* (EDA), além de ter sido realizada a seleção dos *spots* com diferenças de expressão, também foram realizadas duas Análises de Padrões, a primeira demonstrando uma análise global de similaridade entre todos os *spots* de ambas as cepas, e uma segunda análise comparando-se apenas os *spots* de interesse (diferencialmente expressos com $P \leq 0,05$) entre as cepas (Figura 16 e 17).

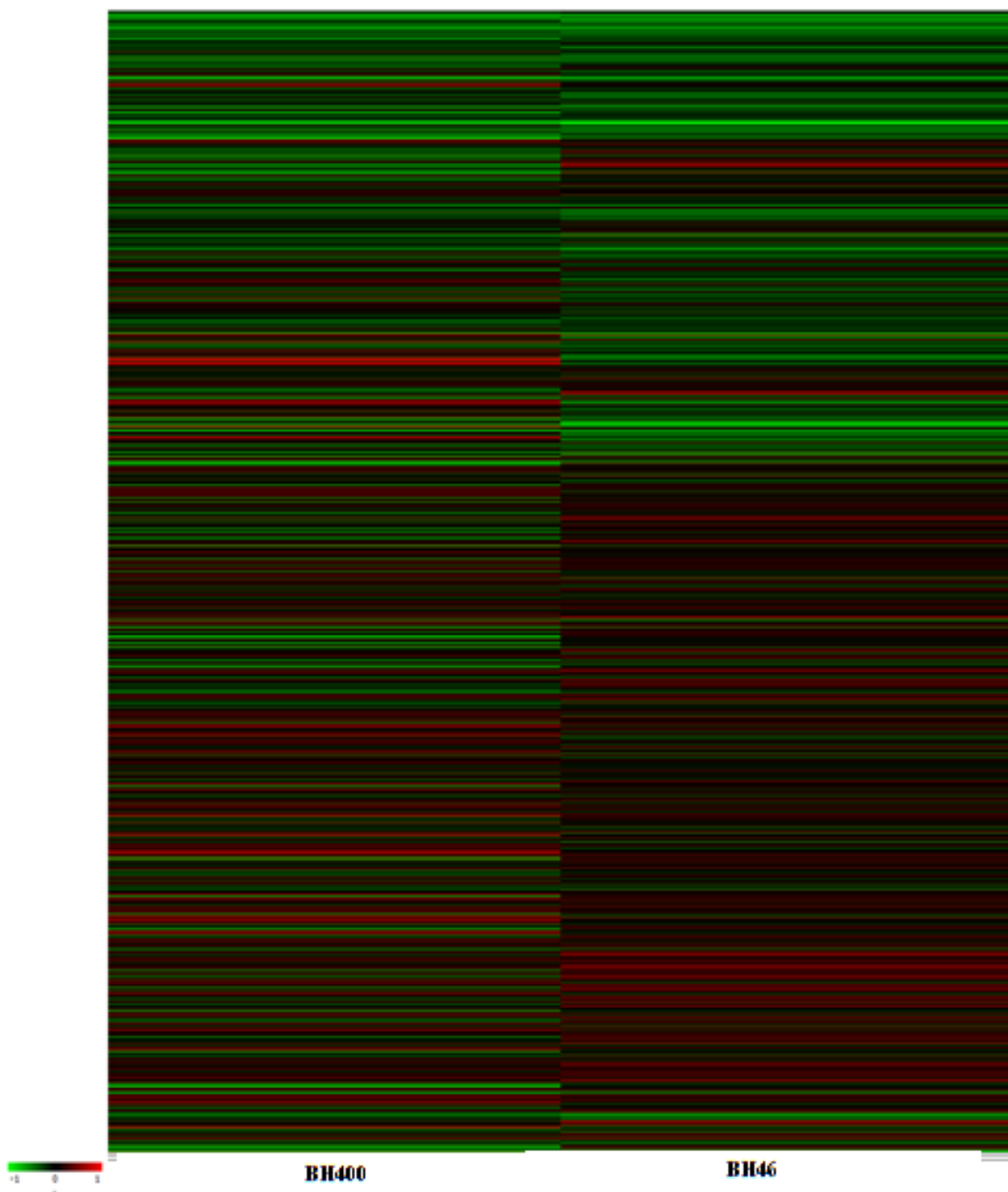


Figura 16: Agrupamento hierárquico (Pattern Analysis) das 2 cepas com base no padrão de *spots* globais detectados. Os valores de expressão relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; verde) para 1 (regulado-positivamente; vermelha).

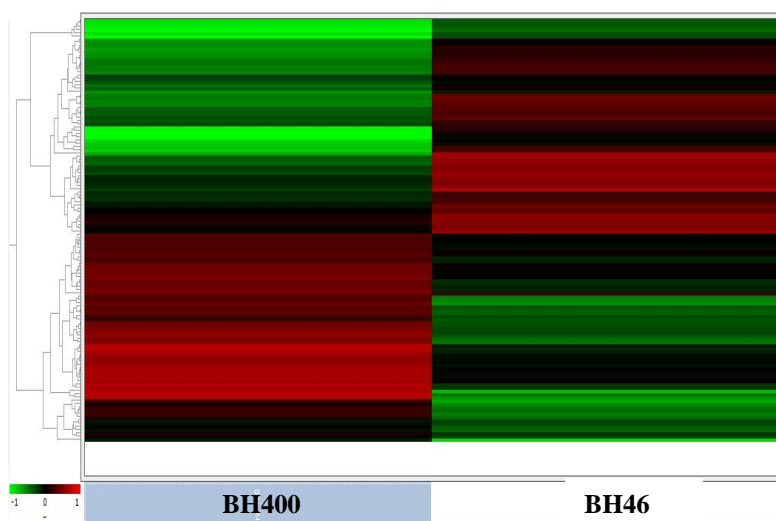


Figura 17: Agrupamento hierárquico (Pattern Analysis) das 2 cepas com base no padrão de *spots* diferencialmente expressos ($P \leq 0,05$) selecionados (*spots de interesse*). Os valores de expressão relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; verde) para 1 (regulado-positivamente; vermelha).

Os *spots* com diferenças de expressão estatisticamente significativa foram selecionados para a excisão do gel e identificação por Espectrometria de Massas (Figura 18).

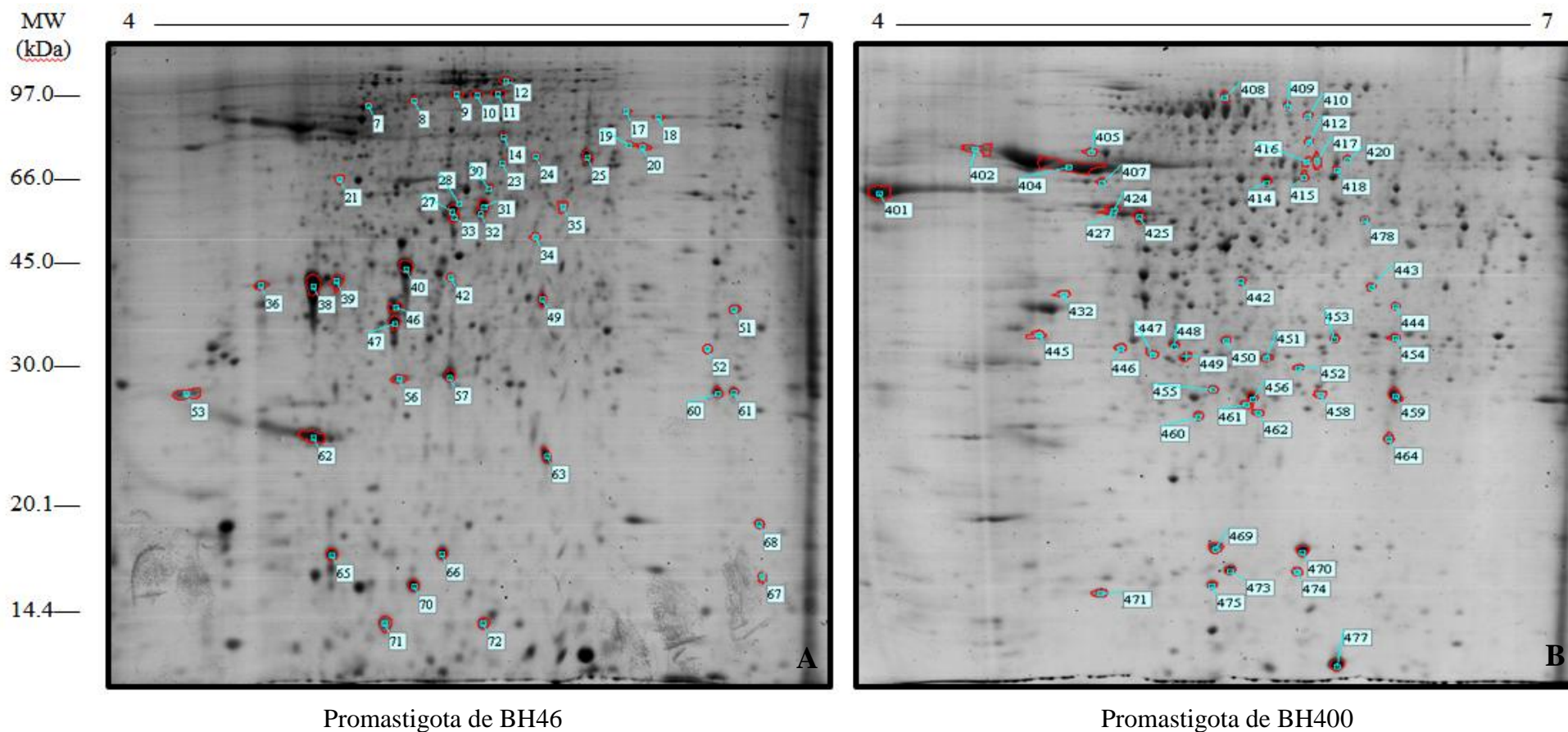


Figura 18: *Spots* selecionados através de *Test T Student* e *One-Way ANOVA* ($P \leq 0,05$) e numerados em géis bidimensionais de promastigota de *L. infantum* das cepas BH46 e BH400 respectivamente, em *strips* de 18cm, pH 4 – 7 com 600 μg de proteína, corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Em A – *spots* mais expressos em Promastigota da cepa BH46 e numerados de 1 até 72; B – *spots* mais expressos em Promastigota da cepa BH400 e numerados de 401 até 478.

5.5 Identificação das Proteínas

Totalizando 96 *spots* selecionados e que foram submetidos à Espectrometria de Massas, foram identificados com sucesso 63 (65,6%) *spots*, porém, 33 *spots* (34,4%) não puderam ser identificados devido ao baixo *score* obtido no MASCOT (Matrix Science, USA - <http://www.matrixscience.com>), não sendo, portanto, estatisticamente significativo. Em BH46, foram identificados 31 *spots* (65,9%) dentre os 47 previamente selecionados para a identificação, como sendo super-expressos nessa cepa. Por outro lado, de 49 *spots* selecionados como sendo super-expressos na cepa BH400, foram identificados 32 *spots* (Tabela 2).

Tabela 2: Dados sobre a seleção e identificação dos *spots* através da Espectrometria de Massa: Os *spots* enumerados que estão em vermelho foram identificados pelo MALDI, os demais não obtiveram um *score* significativo.

Cepa	Nº <i>Spots</i>	<i>Spots</i> selecionados	Numeração dos <i>spots</i> selecionados	Proteínas identificadas
BH46	1377	47	7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 42, 46, 47, 49, 51, 52, 53, 56, 57, 60, 61, 62, 63, 65, 66, 67, 68, 70, 71, 72.	31
BH400	1100	49	401, 402, 404, 405, 407, 408, 409, 410, 412, 414, 415, 416, 417, 418, 420, 424, 425, 427, 432, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 458, 459, 460, 461, 462, 464, 467, 469, 470, 471, 473, 474, 475, 477, 478.	32
Total	2477	96	-	63

Os 63 *spots* que foram identificados corresponderam a 36 proteínas. Isso se deve ao fato de algumas proteínas terem sido encontradas várias vezes em diferentes *spots*, devido às isoformas das proteínas ou alterações pós-traducionais. Um exemplo é a Beta-Tubulina, que foi encontrada em 5 diferentes *spots* na cepa BH46 e a Heat-Shock Protein 70 (HSP-70) encontrada em 3 diferentes *spots* na cepa BH400.

Na Tabela 3 está a lista de proteínas identificadas, a massa molecular e o pI preditos e experimentais dessas proteínas, além do *GenInfo Identifier* (GI) e em qual

cepa foram super-expressas. Observam-se as proteínas: Enolase, Triparredoxina e Peroxirredoxina aumentadas em ambas as cepas, entretanto, apresentam significativas diferenças de MM e pI nas diferentes cepas indicando alteração na funcionalidade desempenhada pela proteína.

Tabela 3: Lista de proteínas identificadas, com o número do *spot*, a massa molecular e o pI experimental e preditos respectivamente, das proteínas, além do *GenInfo Identifier* (GI) e em qual cepa estão super-expressas.

Nº <i>Spot</i>	Nome da Proteína (pI/Mr exp - pred)	GI	Cepa
B.401	Antígeno solúvel PSA-34S da superfície de Promastigota (4.2/53.00 - 4.72/35.55)	gi 264665718	↑ BH400
B.402	beta-tubulina (4.4/58.00 - 4.69/50.30)	gi 1296832	↑ BH400
B.409	metalo-peptidase, Clan MA(E), Família M3 (5.77/64.00 - 5.61/77.68)	gi 401423944	↑ BH400
B.414	Enolase (5.86/54.00 - 5.33/46.63)	gi 146081643	↑ BH400
B.415	S-adenosil homocisteína hidrolase (5.84/55.00 - 5.66/48.52)	gi 401420516	↑ BH400
B.417	Subunidade b da ATP sintetase vacuolar (5.90/57.00 - 5.81/55.89)	gi 146092411	↑ BH400
B.420	Subunidade b da ATP sintetase vacuolar (6.03/57.00 - 5.81/55.89)	gi 146092411	↑ BH400
B.424	Proteína de Choque Térmico-70 (HSP-70) (5.01/51.00 - 5.31/50.51)	gi 365927246	↑ BH400
B.425	Proteína de Choque Térmico-70 (HSP-70) (5.12/50.00 - 5.31/50.51)	gi 365927246	↑ BH400
B.442	Precursor da proteína Reiske Ferro-Enxofre (5.57/44.00 - 5.91/34.04)	gi 339899227	↑ BH400
B.444	Fator de Elongação 2 (6.24/41.00 - 5.77/94.94)	gi 146103554	↑ BH400
B.445	Proteína 14-3-3 like (4.68/38.00 - 4.79/29.78)	gi 146104107	↑ BH400
B.446	Proteína Hipotética Conservada (5.04/37.00 - 5.37/29.14)	gi 401421092	↑ BH400
B.447	Fosfomanomutase (5.18/36.00 - 5.18/28.23)	gi 401420112	↑ BH400
B.448	Proteína do Choque Térmico-70 (HSP-70) (5.27/37.00 - 6.25/56.63)	gi 316936317	↑ BH400
B.449	Fosfomanomutase (5.32/36.00 - 5.18/28.23)	gi 401420112	↑ BH400
B.450	Proteína de Choque Térmico (5.50/38.00 - 5.41/71.40)	gi 758136	↑ BH400
B.453	2,4-dihidroxihept-2-ano-1,7-dioico ácido aldolase (5.68/36.00 - 5.80/30.72)	gi 146089119	↑ BH400
B.455	Subunidade alpha 2 do Proteasoma (5.44/33.00 - 5.43/25.36)	gi 154337338	↑ BH400
B.458	Peroxirredoxina (5.91/33.00 - 6.90/25.58)	gi 401422277	↑ BH400
B.459	Triparedoxina Peroxidase Citoplasmática (6.24/33.00 - 6.73/22.37)	gi 145411494	↑ BH400
B.460	Proteína Rab 1 ligante a GTP (5.38/31.00 - 5.55/22.46)	gi 339898641	↑ BH400

B.461	Peroxirredoxina (5.59/32.00 - 6.90/ 25.58)	gi 401422277	↑BH400
B.462	Subunidade V da Citocromo C oxidase (5.64/31.00 - 6.10/22.38)	gi 146089942	↑ BH400
B.464	Triparrredoxina Peroxidase Citoplasmática (6.21/29.00 - 6.73/22.37)	gi 145411494	↑ BH400
B.469	Endorribonuclease L-PSP (pb5) (5.45/19.00 - 5.87/17.30)	gi 146087017	↑ BH400
B.470	Endorribonuclease L-PSP (pb5) (pb5) (5.83/19.00 - 5.87/17.30)	gi 146087017	↑ BH400
B.471	Pequena Proteína Miristoilada 1 / calpaína-like cisteína peptidase (4.95/16.00 - 5.31/15.15)	gi 146085415	↑ BH400
B.473	Triparrredoxina (5.52/17.00 - 5.23/16.80)	gi 157781821	↑ BH400
B.475	Cofilina-like (5.44/16.00 - 5.30/15.85)	gi 401416034	↑ BH400
B.477	Proteína de Membrana de Kinetoplasteidos de 11 kDa (KMP-11) (5.98/11.00 - 5.96/11.28)	gi 146101120	↑ BH400
B.478	Glutamina Sintetase (6.11/50.00 - 5.71/42.89)	gi 401415106	↑ BH400
A.7	Precursor Mitocondrial Chaperonina HSP60 (5.07/62.00 - 5.33/ 59.66)	gi 146104321	↑ BH46
A.8	Chaperonina HSP60 (5.26/63.00 - 5.33/ 60.85)	gi 146104317	↑ BH46
A.10	Precursora Mitocondrial da Proteína 1 relacionada com a Proteína de Choque Térmico HSP-70 (5.53/63.00 - 5.80/ 72.08)	gi 146093966	↑ BH46
A.11	Precursora Mitocondrial da Proteína 1 relacionada com a Proteína de Choque Térmico HSP-70 (5.62/64.00 - 6.00/ 69.31)	gi 146093964	↑ BH46
A.14	Enolase (5.64/58.00 - 5.33/ 46.63)	gi 146081643	↑ BH46
A.20	Fator de iniciação 4 alpha (6.24/56.00 - 5.83/ 45.35)	gi 146075141	↑ BH46
A.23	Actina (5.64/54.00 - 5.41/ 42.30)	gi 146076586	↑ BH46
A.25	alpha tubulina (6.00/55.00 - 5.08/ 54.94)	gi 339897551	↑ BH46
A.27	alpha tubulina (5.43/48.00 - 5.08/ 54.94)	gi 339897551	↑ BH46
A.28	Proteína Hipotética Conservada (5.46/49.00 - 5.32/ 41.15)	gi 146094146	↑ BH46
A.30	Proteína Disulfide Isomerase (5.58/51.00 - 5.42/ 52.76)	<u>gi 146102742</u>	↑ BH46
A.31	beta tubulina (5.56/49.00 - 4.71/ 50.39)	gi 146078076	↑ BH46

A.33	Subunidade beta da Piruvato desidrogenase E1 (5.44/48.00 - 5.64/ 38.44)	gi 146089026	↑ BH46
A.36	Fator de alongação da transcrição 1-beta (4.60/41.00 - 4.61/ 23.22)	gi 146104117	↑ BH46
A.38	beta tubulina (4.83/41.00 - 4.71/ 50.39)	gi 146078076	↑ BH46
A.39	beta tubulina (4.93/41.00 - 4.71/ 50.39)	gi 146078076	↑ BH46
A.39	beta tubulina (4.93/41.00 - 4.74/ 50.34)	gi 146086185	↑ BH46
A.40	alpha tubulina (5.23/43.00 - 5.08/ 54.94)	gi 339897551	↑ BH46
A.46	alpha tubulina (5.18/39.00 - 5.08/54.94)	gi 339897551	↑ BH46
A.47	alpha tubulina (5.18/38.00 - 5.08/54.94)	gi 339897551	↑ BH46
A.53	Fator de Liberação de Histamina IgE-dependente (4.29/33.00 - 4.39/19.60)	gi 146088052	↑ BH46
A.56	Peroxirredoxina (5.20/34.00 - 6.43/25.58)	gi 146086967	↑ BH46
A.57	Peroxirredoxina (5.42/34.00 - 6.43/25.58)	gi 146086967	↑ BH46
A.62	beta tubulina (4.83/30.00 - 4.71/50.39)	gi 146078076	↑ BH46
A.63	Precursor Mitocondrial da Proteína Ribonucleica p18 (5.83/28.00 - 6.74/21.64)	gi 146081837	↑ BH46
A.65	alpha tubulina (4.91/20.00 - 5.08/54.94)	gi 339897551	↑ BH46
A.66	Triparedoxina (5.38/20.00 - 5.24/16.80)	gi 146093061	↑ BH46
A.68	Ciclofilina 2 (6.74/22.00 - 6.51/20.46)	gi 146070754	↑ BH46
A.70	Triparedoxina (5.26/17.00 - 5.24/16.80)	gi 146093061	↑ BH46
A.71	Triparedoxina (5.13/14.00 - 5.24/16.80)	gi 146093061	↑ BH46
A.72	Proteína Hipotética Conservada (5.56/13.00 - 5.53/13.38)	gi 146084262	↑ BH46

Interessantemente, algumas proteínas identificadas demonstraram alterações nos valores de pI e massa molecular, indicando a possibilidade de modificações pós-traducionais, comuns em Trypanosomatídeos, que regulam a expressão de proteínas pós-transcricionalmente, de acordo com Rosenzweig *et al*, 2008, Cuervo *et al*, 2010 e Paape *et al*, 2011.

5.6- Organização dos dados proteômicos

As 36 proteínas identificadas pelo MALDI foram agrupadas em um total de 14 categorias funcionais (12 categorias na cepa BH46 e 13 na cepa BH400) através do banco de dados FunCat - Functional Catalogue of Proteins, MIPS – *Munich Information Center for Protein Sequences* (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/>).

As categorias funcionais encontradas para as 36 proteínas identificadas foram: Defesa Celular, Resposta ao Estresse e Virulência; Energia; Regulação da Proliferação celular; Metabolismo; Transporte Celular; Biogênese de Componentes Celulares; Proteína com Função de Ligação ou Cofator (estrutural ou catalítica); Síntese de Proteína; Destino Celular (enovelamento, modificação, crescimento ou morte); Comunicação Celular/Mecanismo de Transdução de Sinal; Interação com o Ambiente; Regulação do Metabolismo e da Função de Proteínas; Proteína Hipotética e Processo Biológico Desconhecido.

Foi observado que o grupo funcional de Defesa Celular, Resposta ao Estresse e Virulência representou grande parte das proteínas de em ambas as cepas com 13,5% e 12,8% em BH46 e BH400, respectivamente.

Algumas proteínas foram classificadas em dois ou mais grupos funcionais diferentes, conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Categorização funcional das proteínas: As proteínas identificadas pelo MALDI, através do banco de dados FunCat - Functional Catalogue of Proteins, MIPS – *Munich Information Center for Protein Sequences* (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/>) foram agrupadas de acordo com a categoria funcional. O ID do banco de dados *String9.0* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* - <http://string-db.org>) também está sendo demonstrado, onde foi realizado uma predição da interação entre as proteínas identificadas com proteínas já existentes ou preditas; A identificação do *spot* e o total de proteínas pertencentes à essa categoria funcional.

Categoria Funcional	String ID	Nº do <i>spot</i>	Total
METABOLISMO			12
S-adenosil homocisteína hidrolase	LinJ36.2840	415	
Fator de Elongação 2	LinJ36.2480	444	
Fosfomanomutase	LinJ36.4490	447;449	
2,4-dihidroxihept-2-ano-1,7-dioico ácido aldolase	LinJ25.2100	453	
Pequena Proteína Miristoilada 1	LinJ20.1350	471	
Glutamina Sintetase	LinJ06.0370	478	
Fator de iniciação 4 alpha	LinJ01.0790	20	
alpha tubulina	LinJ13.0260	25; 27; 40; 46; 47; 65	
Proteína Dissulfide Isomerase	LinJ36.0630	30	
Subunidade beta da Piruvato desidrogenase E1	LinJ25.1800	33	
Enolase	LinJ14.1250	14; 414	
Subunidade b da ATP sintetase vacuolar	LinJ28.2540	417; 420	
TRANSPORTE CELULAR			4
Subunidade b da ATP sintetase vacuolar	LinJ28.2540	417; 420	
Proteína Rab 1 ligante a GTP	LinJ31.0990	460	
Subunidade V da Citocromo C oxidase	LinJ26.1720	462	
Proteína Dissulfide Isomerase	LinJ36.0630	30	

BIOGÊNESE DE COMPONENTES CELULARES			3
beta-tubulina	LinJ08.1170	402; 31; 38; 39; 62	
alpha tubulina	LinJ13.0260	25; 27; 40; 46; 47; 65	
Proteína de Membrana de Kinetoplastideos 11 kDa (KMP-11)	LinJ35.2280	477	
ENERGIA			4
Precursor da Proteína Reiske Ferro-Enxofre	LinJ35.1700	442	
Subunidade V da Citocromo C oxidase	LinJ26.1720	462	
Subunidade beta da Piruvato desidrogenase E1	LinJ25.1800	33	
Enolase	LinJ14.1250	14; 414	
REGULAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR			1
Proteína de Membrana de Kinetoplastideos 11 kDa (KMP-11)	LinJ35.2280	477	
REGULAÇÃO DO METABOLISMO E DE FUNÇÃO DE PROTEÍNAS			1
Fator de Elongação da Transcrição 1-beta	LinJ36.3930	36	
SÍNTESE DE PROTEÍNA			3
Elongation factor 2	LinJ36.2480	444	
Fator de iniciação 4 alpha	LinJ01.0790	20	
Fator de Elongação da Transcrição 1-beta	LinJ36.3930	36	

DEFESA CELULAR, RESPOSTA AO ESTRESSE E VIRULÊNCIA**7**

Proteína de Choque Térmico-70 (HSP-70)	LinJ28.2920	10; 11; 24; 25; 448; 450
Enolase	LinJ14.1250	14; 414
Peroxirredoxina	mTXNPx	56; 57; 458; 461
Triparredoxina Peroxidase Citoplasmática	LinJ15.1110	459; 464; 473
Proteína de Membrana de Kinetoplastideos 11 kDa (KMP-11)	LinJ35.2280	477
Precursor Mitocondrial Chaperonina HSP60	LinJ36.4550	7; 8
Triparredoxina	TXN2	66; 70; 71

DESTINO CELULAR (ENOVELAMENTO, MODIFICAÇÃO, CRESCIMENTO OU MORTE)**8**

Proteína 14-3-3 like	LinJ36.3900	445
Subunidade alpha 2 do Proteasoma	91E11	455
Precursor Mitocondrial Chaperonina HSP60	LinJ36.4550	7; 8
alpha tubulina	LinJ13.0260	25; 27; 40; 46; 47; 65
Proteína Dissulfide Isomerase	LinJ36.0630	30
Ciclofilina 2	LinJ06.0120	68
Metallo-Peptidase, Clan MA(E), Família M3	LinJ02.0660	409
beta-tubulina	LinJ08.1170	402; 31; 38; 39; 62

PROTEÍNA COM FUNÇÃO DE LIGAÇÃO OU COFATOR (ESTRUTURAL OU CATALÍTICA)**21**

Precursor da Proteína Reiske Ferro-Enxofre	LinJ35.1700	442
Proteína 14-3-3 like	LinJ36.3900	445
Proteína Rab 1 ligante a GTP	LinJ31.0990	460

Subunidade V da Citocromo C oxidase	LinJ26.1720	462
Pequena Proteína Miristoilada 1	LinJ20.1350	471
Cofilina-like	LinJ29.0660	475
Precursor Mitocondrial Chaperonina HSP60	LinJ36.4550	7; 8
Fator de iniciação 4 alpha	LinJ01.0790	20
Actina	LinJ04.1250	23
alpha tubulina	LinJ13.0260	25; 27; 40; 46; 47; 65
Subunidade beta da Piruvato desidrogenase E1	LinJ25.1800	33
Fator de Elongação da Transcrição 1-beta	LinJ36.3930	36
Precursor Mitocondrial da Proteína Ribonucleica p18	LinJ15.0330	63
Metallo-Peptidase, Clan MA(E), Família M3	LinJ02.0660	409
beta-tubulina	LinJ08.1170	402; 31; 38; 39; 62
Enolase	LinJ14.1250	14; 414
S-adenosil homocisteína hidrolase	LinJ36.2840	415
Subunidade b da ATP sintetase vacuolar	LinJ28.2540	417; 420
Proteína de Choque Térmico-70 (HSP-70)	LinJ28.2920	10; 11; 24; 25; 448; 450
Fator de Elongação 2	LinJ36.2480	444
Subunidade alpha 2 do Proteasoma	91E11	455
COMUNICAÇÃO CELULAR/MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL		1
Proteína Rab 1 ligante a GTP	LinJ31.0990	460
INTERAÇÃO COM O AMBIENTE		2
Proteína de Membrana de Kinetoplastideos 11 kDa (KMP-11)	LinJ35.2280	477
Proteína Dissulfide Isomerase	LinJ36.0630	30

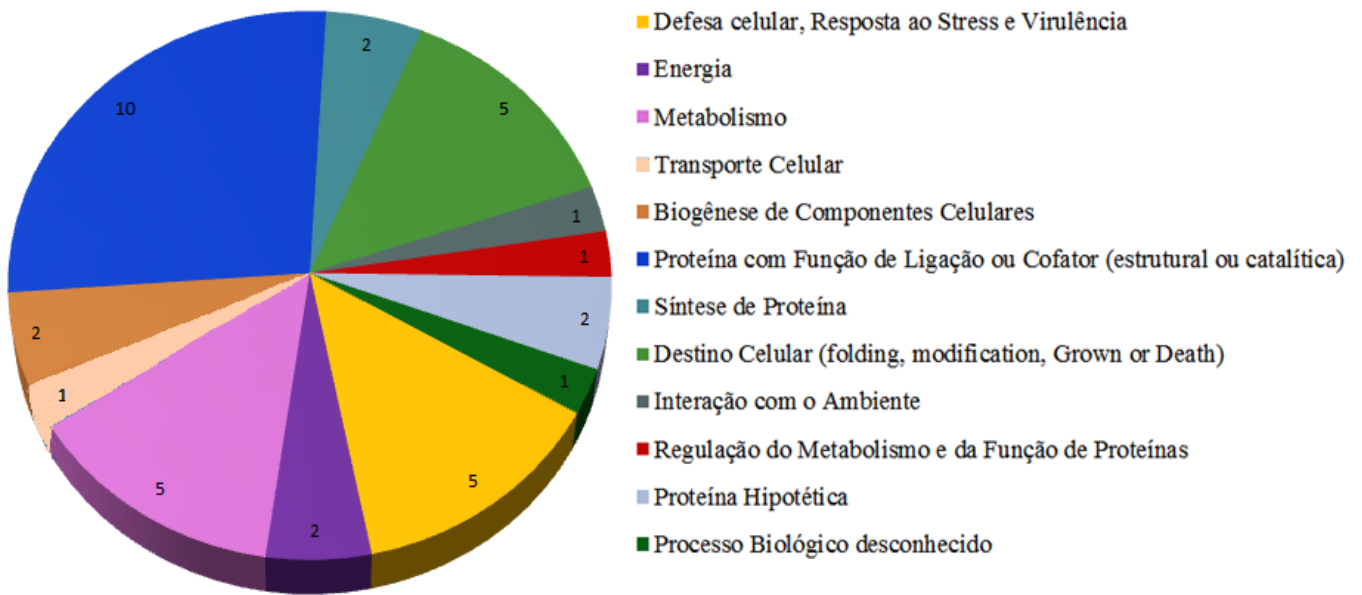
PROCESSO BIOLÓGICO DESCONHECIDO**3**

Endorribonuclease L-PSP (pb5)		469; 470
Fator de Liberação de Histamina IgE-dependente	LinJ23.0220	53
Antígeno solúvel PSA-34S da superfície de Promastigota	LinJ24.1180	401
	-	

PROTEÍNA HIPOTÉTICA**3**

Proteína Hipotética Conservada		28
Proteína Hipotética Conservada		72
Proteína Hipotética Conservada		446

Categorias Funcionais na cepa BH46



Categorias Funcionais na cepa BH400

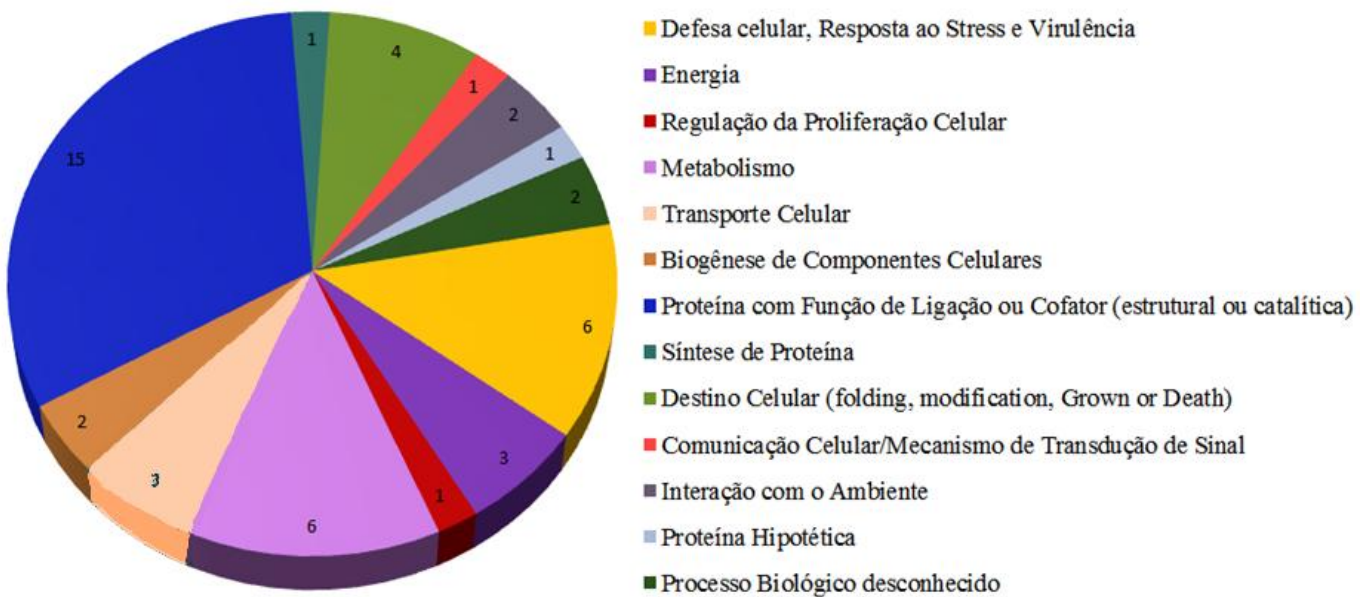


Figura 19: Categorização funcional das proteínas identificadas por Espectrometria de Massa das cepas BH46 e BH400. Ao todo, as proteínas foram agrupadas em 14 categorias funcionais, sendo que 12 delas contendo as proteínas super-expressas na cepa BH46 e 13 contendo proteínas super-expressas na cepa BH400.

Foram encontradas 13 proteínas sendo super-expressas exclusivamente na cepa BH46, enquanto que na cepa BH400, foram encontradas 20 proteínas super-expressas sendo exclusivas dessa cepa. Além disso, foram encontradas 3 proteínas em comum entre ambas as cepas (Enolase, Triparredoxina e Peroxirredoxina).

Como o foco do nosso trabalho foram as proteínas envolvidas na virulência da cepa com maior virulência (BH400), a predição das interações entre as proteínas identificadas através do banco de dados *String* 9.0 (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* - <http://string-db.org>) foram feitas primeiramente para interações das proteínas super-expressas nesta cepa (Figura 20).

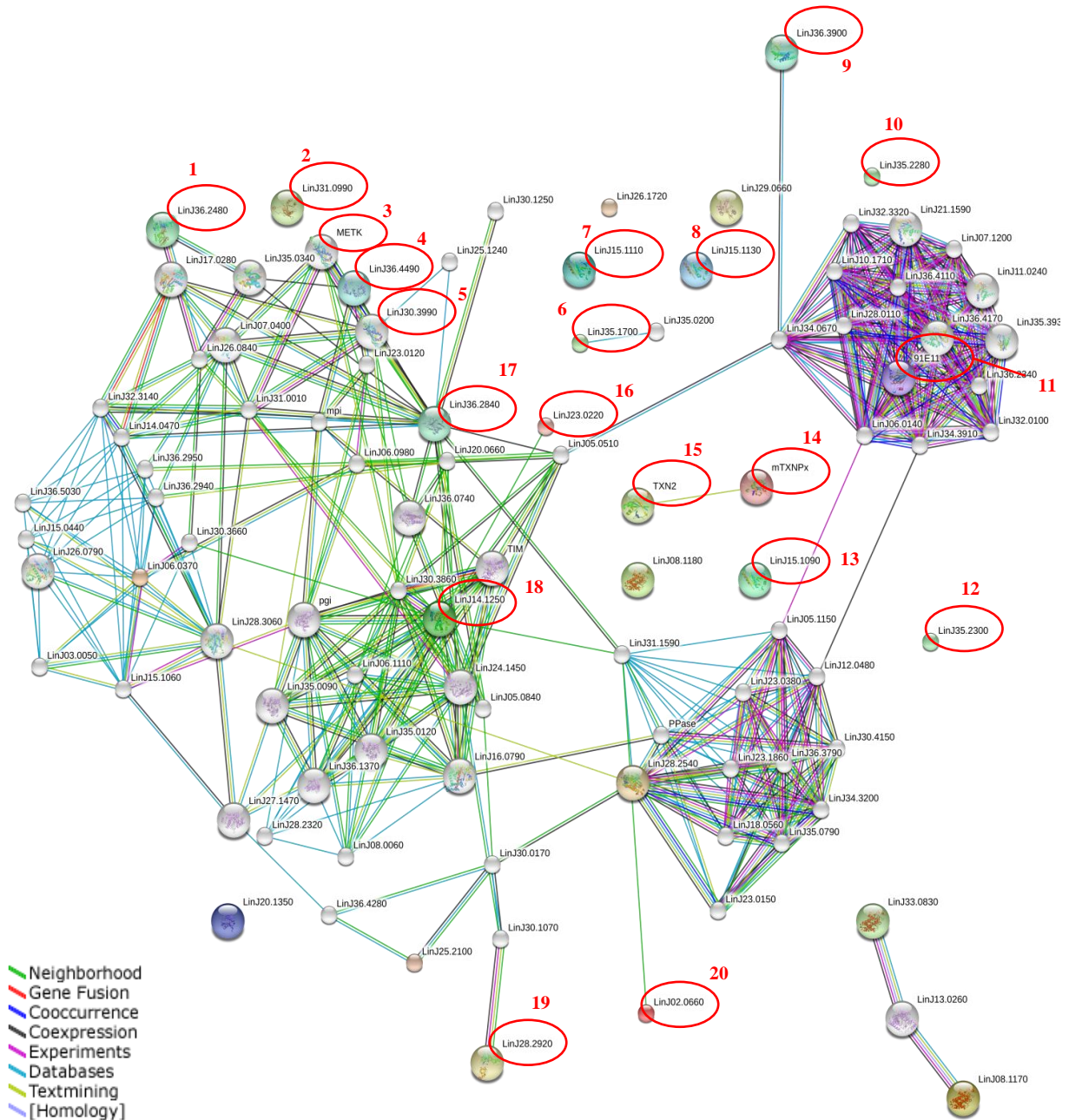


Figura 20: Rede de interações entre proteínas identificadas e relacionadas com a virulência (em vermelho) em BH400 através do banco de dados *String 9.0* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* - <http://string-db.org>): 1 - Fator de Elongação 2; 2 - Proteína Rab 1 ligante a GTP; 3 - S-adenosil homocisteína hidrolase; 4 – Fosfomanomutase; 5 - S-adenosil homocisteína hidrolase; 6 - Precursor da proteína Reiske Ferro-Enxofre; 7 - Triparredoxina Peroxidase; 8 - Triparredoxina Peroxidase; 9 - Proteína 14-3-3 like; 10 - Proteína de membrana de Kinetoplastideos 11 kDa (KMP-11); 11 - Subunidade alpha 2 do Proteasoma; 12 - Proteína de membrana de Kinetoplastideos 11 kDa (KMP-11); 13 - Triparredoxina Peroxidase; 14 – peroxirredoxina; 15 – Triparredoxina; 16 - Endorribonuclease L-PSP (pb5); 17 - S-adenosil homocisteína hidrolase; 18 – Enolase; 19 - Proteína de Choque Térmico-70 (HSP-70); 20 - Metalo-Peptidase, Clan MA(E), Família M3.

Posteriormente foi realizada a predição de interação das 3 proteínas em comum nas duas cepas (Enolase, Triparredoxina e Peroxirredoxina) (Figura 21).

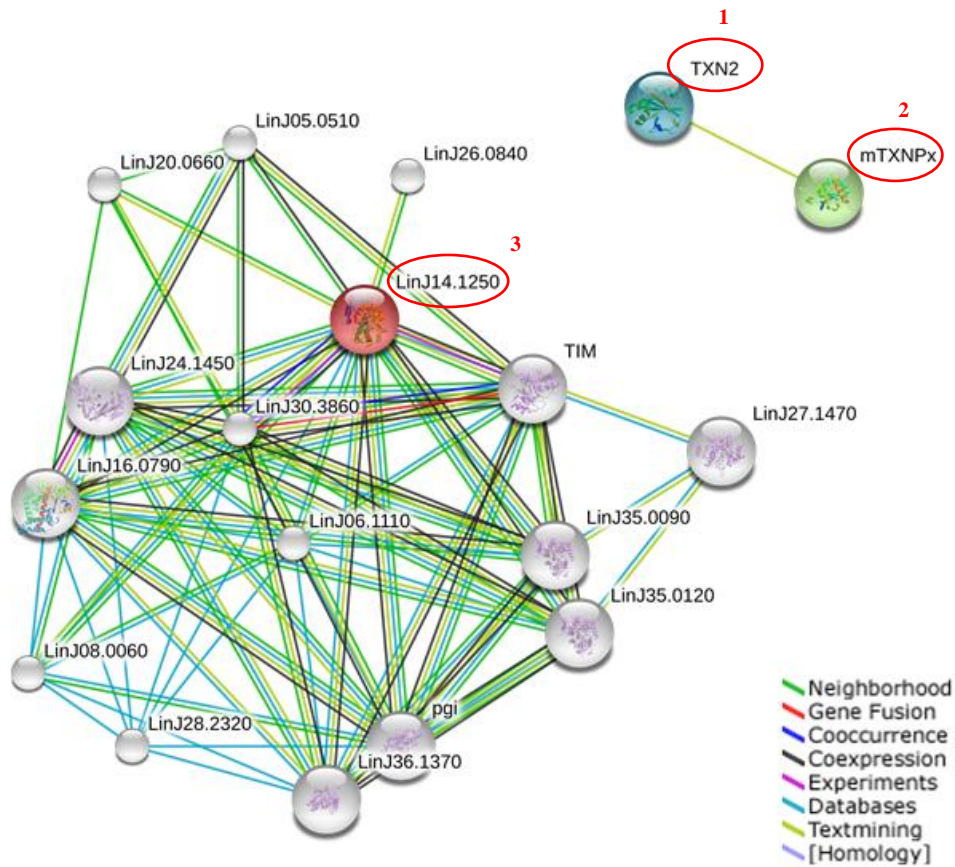


Figura 21: Rede de interações entre proteínas identificadas e relacionadas com a virulência (em vermelho) em ambas as cepas através do banco de dados *String* 9.0 (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* - <http://string-db.org>): 1 – Triparredoxina; 2 – Peroxirredoxina; 3 – Enolase.

6 DISCUSSÃO

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) são susceptíveis a infecções por diferentes espécies de *Leishmania* e são bastante utilizados como modelos experimentais no estudo da Leishmaniose Visceral (LV) (Gifawesen e Farrel, 1989). São utilizados como modelos para LV por *L. donovani* desde 1960 (Ott *et al*, 1967). Assim, como na LV humana, a doença em hamsters causada por cepas viscerotrópicas é caracterizada por evolução progressiva, exibindo sinais clínicos e sintomas como astenia, anemia, hepato-esplenomegalia, hipergamaglobulinemia, desidratação e podendo culminar na morte (Farrel *et al*, 1976; Rodrigues *et al*, 1992), portanto o curso da doença se assemelha muito à LV humana.

O modelo de estudo ideal para LV, a fim de reproduzir a doença como ela realmente ocorre na natureza, seria a utilização de cães infectados com *L. infantum*. Porém, esse modelo pode apresentar algumas dificuldades, tais como custo, manutenção, e uso de grandes quantidades de animais, restringindo o número de animais utilizados para cada experimento. Portanto, o uso de Hamsters como modelo experimental para infecções de *L. infantum* é bastante aceito e muito utilizado, uma vez que o curso da infecção nesse modelo mimetiza a doença em modelos caninos (Riça-Capela *et al*, 2003).

Virulência foi definida por Chang e colaboradores (2003) como sendo o grau de patogenicidade de um micro-organismo geneticamente dotado dessa capacidade, quando se manifesta contra um hospedeiro com um sistema imune intacto sob condições normais. Consistem em basicamente dois grupos: O primeiro grupo consiste em determinantes invasivos/evasivos, que estão presentes na superfície do parasito e moléculas secretadas. A atividade dessas moléculas visa ajudar no estabelecimento da infecção e superar barreiras imunológicas e não-imunológicas do hospedeiro. Essas moléculas, não são a causa para a doença, mas são indispensáveis para a infecção, que por sua vez é necessário para o desenvolvimento da doença. O segundo grupo consiste em moléculas “pato-antigênicas” produzidas pelo parasito para a replicação e manutenção da infecção nas células hospedeiras. A interação dessas moléculas com o sistema imune do hospedeiro pode causar imunopatologias, manifestando-se como sinais clínicos, ou seja, o fenótipo virulento (Chang *et al*, 2002; Chang *et al*, 2003).

Alguns componentes do parasito são caracterizados como sendo fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade da *Leishmania* e permite a invasão celular e estabelecimento da infecção no hospedeiro (Matlashewski *et al*, 2001). Alguns desses fatores de virulência em *Leishmania* spp. incluem Glicoinositolfosfolipideos (GILPs), Lipofosfoglianos (LPG), Proteofosfoglicanos (PPG), *Major Surface Protease* (gp63) e a proteína de membrana de kinetoplastidos de 11 kDa (KMP-11).

Várias proteínas são consideradas fatores de virulência em inúmeros organismos patogênicos. Nesse trabalho, inicialmente caracterizamos a virulência de duas cepas de *L. infantum* em ensaios realizados “in vitro” e “in vivo” usando o modelo hamster. Os resultados demonstraram a maior virulência da cepa BH400 em relação a cepa BH 46, como era esperado, porém, não havia antes comprovação experimental. A partir daí, visamos identificar proteínas diferencialmente expressas entre as cepas, partindo do pré-suposto que essas proteínas poderão estar associadas ao fenótipo de virulência.

Avanços recentes na tecnologia de espectrometria de massas e utilização de técnicas de marcação de proteínas como o *Differential Gel Electrophoresis* (DIGE) permitem realizar análises proteômicas qualitativas e quantitativas, podendo-se variar desde órgãos, tecidos e células até organelas subcelulares (Xie *et al*, 2005; Silverman *et al*, 2008).

Em nosso trabalho, os Géis Bidimensionais de promastigotas de *L. infantum* apresentaram uma média em torno de 1000 *spots*. A quantidade de *spots* nos géis bidimensionais do nosso trabalho foi satisfatória, levando em consideração trabalhos semelhantes como Walker *et al*, 2006; Cuervo *et al*, 2007; Paape *et al*, 2008 e Mojtahedi *et al*, 2008 que detectaram uma média de 660, 650, 391 e 600 *spots*/gel, respectivamente. Alguns trabalhos utilizaram o nitrato de Prata como corante das proteínas após a eletroforese bidimensional, um corante 10 vezes mais sensível que o *Coomassie Brilliant Blue G-250* utilizado nos trabalhos citados anteriormente, sendo possível, portanto, uma detecção de maior quantidade de *spots* no gel. Trabalhos que utilizaram a mesma metodologia utilizada em nosso trabalho, conseguiram detectar nos géis cerca de 700 até 1650 *spots*/gel (Dea-Ayuela *et al*, 2006; Brobey *et al*, 2006). Além disso, o Índice de Correlação entre os *spots* no nosso trabalho variam de 0,87 a 0,96. Valores próximos a 1,00 indicam uma boa correlação entre as posições relativas dos *spots* nos géis, consecutivamente, uma boa reprodutibilidade dos géis confeccionados.

A técnica de *Differential Gel Electrophoresis* (DIGE) foi desenvolvida para resolver o problema da baixa reprodutibilidade que pode ocorrer na metodologia de géis bidimensionais, através da marcação de duas amostras com diferentes fluoróforos e separá-las no mesmo gel. As proteínas de cada amostra são marcadas covalentemente com corantes fluorescentes de cores diferentes, que não alteram a migração relativa dessas proteínas durante a eletroforese. No DIGE, cada *spot* idêntico em uma amostra é sobreposto com o seu homólogo diferencialmente marcado na outra amostra, permitindo assim uma detecção mais reprodutível e de fácil detecção. Além disso, o DIGE é uma técnica bastante sensível, sendo capaz de detectar até 0,5 fmol de proteína (Viswanathan *et al*, 2006).

Na literatura, são vários os trabalhos utilizando a abordagem proteômica através do DIGE e espectrometria de massas para identificar fatores de virulência em outros organismos. Xiao e colaboradores (2007) utilizaram a técnica de DIGE, na identificação de fatores que influenciam na virulência de dois tipos de vírus PRRSV (*Porcine reproductive and respiratory syndrome vírus*), responsável por causar a síndrome do Mistério Suíno, com diferenças na virulência. Regidor-Cerrillo e colaboradores (2012) avaliaram mudanças nas expressões de proteína em isolados virulentos e atenuados de *Neospora caninum* através de DIGE e MALDI ToF/ToF.

Há trabalhos também, que demonstram a diferença na patogenicidade nos tecidos de organismos infectados com cepas com diferença na virulência. Um desses trabalhos, realizado por Cao e colaboradores (2012), demonstra através da técnica DIGE e MALDI ToF/ToF a mudança global no perfil proteômico de tecidos da traquéia e rins de frangos infectados com a cepa virulenta e outra cepa avirulenta do coronavírus *Infectious Bronchitis Virus* (IBV).

Entretanto, em *Leishmania*, são poucos os trabalhos que utilizaram dessa metodologia. Morales e colaboradores (2010) através da técnica de DIGE avaliaram extrato de fosfoproteoma de amastigotas axênicas e promastigotas de *L. donovani*. Costa e colaboradores (2011) utilizaram DIGE para identificar proteínas diferencialmente expressas entre amastigotas e promastigotas de *L. infantum*. Pescher e colaboradores (2011) compararam a morfologia, infectividade e expressão de proteínas de amastigotas axênicas e amastigotas esplênicas de *L. donovani*, por meio de DIGE e análises *in silico*. Assim, observa-se que a técnica de DIGE, além de ainda pouco

utilizada em *Leishmania*, não há publicações na literatura consultada dessa abordagem para identificação de fatores de virulência entre cepas nesse parasito.

No presente estudo, foram identificadas 36 proteínas, sendo 20 aumentadas em BH400. Observou-se que algumas proteínas foram identificadas provenientes de diferentes *spots*, além disso, em praticamente todas as proteínas identificadas, observou-se alterações nos valores de Massa Molecular e Ponto Isoelétrico, quando comparados com os valores preditos pelos bancos de dados. Isso indica uma provável modificação pós-traducional nas proteínas, comum em Trypanosomatídeos (Clayton *et al*, 2002; Rosenzweig *et al*, 2008, Cuervo *et al*, 2010 e Paape *et al*, 2011).

Devido ao grande número de proteínas identificadas e a diversidade de funções que apresentam, optamos por organizar nossa discussão conforme dados da literatura sobre proteínas relacionadas com virulência em outras espécies de *Leishmania* e sua predição da Rede de Interações na cepa de maior virulência.

Portanto, na cepa BH400 observou-se a super-expressão da proteína Fator de Elongação 2, envolvida na tradução de proteínas e alongação da cadeia polipeptídica no ribossomo, já descrita como envolvida na virulência de *L. donovani* (Kushawaha *et al*, 2011). Em outros organismos, tem sido demonstrada a interação dessa proteína com proteínas ribossomais para que possa haver a atividade de GTPase (Bargis-Surgey *et al*, 1999). Há predição de que esta interage com a subunidade 60S da Proteína Ribossomal L30 e subunidade 40S da Proteína Ribossomal S16, que constituem subunidades estruturais dos ribossomos, relacionadas com a tradução de proteínas.

Por sua vez, essas proteínas ribossomais interagem com S-adenosil homocisteína Hidrolase aqui identificada, um inibidor competitivo da S-adenosil-L-metionina-dependente de reações metil transferases, desempenhando um papel importante no controle de metilações, regulando a concentração intracelular de S-adenosil homocisteína. Essa proteína já tinha sido relacionada com virulência em *L. braziliensis* e *L. donovani*, e agora identificada pelo nosso trabalho na cepa mais virulenta de *L. infantum*, além de ser descrita como provável fator de virulência por Mottram *et al*, 2004; Cuervo *et al*, 2007 e Walker *et al*, 2006. Além disso, a proteína S-adenosil homocisteína Hidrolase também interage com a proteína Subunidade alpha da ATPase envolvida no transporte de prótons através da membrana, crucial para a síntese de ATP.

A subunidade 60S da Proteína Ribossomal L30 e subunidade 40S da Proteína Ribossomal S16 citadas anteriormente, juntamente com a proteína S-adenosil homocisteína Hidrolase também interagem com a proteína Fosfomanomutase, super-expressa em BH400, que catalisa a conversão de manose-6-fosfato em manose-1-fosfato, essencial na ativação de manose e a biossíntese de glicoconjugados em todos os eucariotas. Foi observado que a ausência dessa proteína em *Leishmania mexicana* resulta na perda de virulência do parasito, sugerindo que a Fosfomanomutase é um possível fator de virulência e alvo terapêutico promissor para o desenvolvimento de inibidores anti-Leishmaniose (Kedzierski *et al*, 2006).

Também aumentada em BH400, identificamos a proteína Enolase. Essa proteína está envolvida na via glicolítica, presente na superfície celular de vários organismos, inclusive na *Leishmania*, onde tem se demonstrado a interação da Enolase com células do hospedeiro. Além disso, tem sido descrita como sendo um possível fator de virulência nas espécies *L. mexicana*, *L. donovani* e *L. major* (Swenerton *et al*, 2011). Possui a capacidade de atuar como proteínas de choque térmico, ligante ao DNA para desempenhar um papel na transcrição, receptor de plasminogênio e na migração de células e ativação de metalo-proteases (Vanegas *et al*, 2007). Várias outras funções intra ou extracelular foram também relatadas para diferentes organismos (Pancholi *et al*, 2001).

Há predição que Enolase interage com várias moléculas, dentre elas estão a Triose-fosfato Isomerase, envolvida na glicólise, gliconeogênese e importante também no balanceamento de metabólitos na via fosfato-pentose; Transketolase, com atividade de transferase, e catálise de transferência transaldolase reversível de um grupo ketol; Domínio-PAS contendo Fosfoglicerato Quinase; Glucose-6-Fosfato Isomerase, envolvida na conversão anaeróbia enzimática da glicose em lactato ou piruvato e intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, resultando em energia armazenada na forma de trifosfato de adenosina (ATP); Subunidade 40S da Proteína Ribossomal SA, constitui uma subunidade da estrutura dos ribossomos, estando relacionada com a tradução de proteínas; Fator de Elongação G, envolvida na tradução de proteínas e alongamento da cadeia no ribossomo; Subunidade Beta da ATPase, envolvida no transporte de prótons através da membrana, importante para a síntese de ATP; Proteína Diftina Sintetase-like, proteína envolvida na metiltransferase e reparo do DNA; Transaldolase, enzima importante no balanceamento de metabólitos na via fosfato-

pentose, envolvida também na via bioquímica em que a glucose-6-fosfato é oxidado a 6-fosfogluconato com a produção de NADPH; Proteína Fosfoglicerato Mutase, com atividade isomerase, responsável pelas alterações geométricas ou estruturais dentro de uma molécula, podendo ser crucial para a sobrevivência do parasito (UniProt.org).

Registramos também maior abundância, na cepa mais virulenta, da proteína 14-3-3 like capaz de se ligar a fosfoproteínas, participando do controle de diversos processos celulares, tais como metabolismo, transdução de sinal, controle do ciclo celular, tráfego de proteínas, fatores de transcrição, resposta ao estresse e regulação da atividade apoptótica e de morte celular, podendo alterar o prolongamento do tempo de vida de células hospedeiras infectadas com *L. donovani* (Silverman *et al*, 2008; Chawla *et al*, 2011). Essa proteína apresenta predição de interação com a Subunidade Regulatória do Proteasoma 19S, Metalo-Peptidase, Clan MP, Família M67, pertencentes a um complexo de múltiplas subunidades que catalisa a degradação de proteínas. Também há predição de interação entre a Subunidade alpha 2 do Proteasoma, proteína pertencente ao proteassoma, responsável pela degradação de proteínas que tenham sido marcados para destruição por ubiquitinação ou por outros meios (Malygin *et al*, 2000).

Em nosso trabalho, foi encontrada super-expressa em BH400 a Metalo-Peptidase, ClanMA(E), Família M3, possuindo atividade metalo-proteinase e de proteólise e considerada fator de virulência em *L. major* e *L. mexicana* (Silva-Almeida *et al*, 2012). Esta proteína, por predição, parece interagir com a proteína de Translocação de Proton Pirofosfatase 1, possuindo a função de hidrólise de moléculas. Juntamente com a proteína Endorribonuclease L-PSP (pb5), também encontrada super-expressa na cepa BH400, desempenham um papel importante na sobrevivência intracelular do parasito (Silverman *et al*, 2008).

Outra proteína com super-expressão na cepa BH400 foi a Precursora da Proteína Reiske Ferro-Enxofre, envolvida na oxidoreductase e atividade de ubiquitinação do Citocromo-c, um dos estímulos responsáveis pela programação da morte celular do hospedeiro (apoptose) (Kadenback *et al*, 2004; Gannavaram *et al*, 2012). Através da rede de interações predita, observou a interação dessa proteína com uma Proteína Hipotética.

A proteína Rab 1 ligante a GTP foi classificada de acordo com Silverman e colaboradores (2008) como candidato a fator de virulência em *L. donovani*, devido a

sua associação com o transporte vesicular de proteínas, podendo regular o tráfego desse transporte, afetando a secreção de proteínas do parasito (Silverman *et al*, 2008).

O estresse oxidativo pode influenciar na sobrevivência dos Tripanossomatídeos, nas interações entre parasito-hospedeiro uma grande quantidade de intermediários Reativos de Oxigênio e Óxido Nítrico (ROI e NO) é gerada pelo hospedeiro para criar condições desfavoráveis para os agentes patogênicos invasores, e conseqüentemente para a sua eliminação. Portanto, a habilidade do parasito para evadir os efeitos oxidativos está diretamente ligada à virulência e ao estabelecimento da infecção. Evidentemente, para a sobrevivência e estabelecimento da infecção pela *Leishmania*, a mesma deve evadir os efeitos do estresse oxidativos gerados pelo hospedeiro. Proteínas como a Triparredoxina e a Peroxirredoxina, também encontradas no nosso trabalho como sendo abundantes em ambas as cepas, não apenas são cruciais para a sobrevivência durante o estresse oxidativo, mas também para aumentar a capacidade infectante do parasito, garantindo o estabelecimento e o sucesso da infecção. Iyer e colaboradores (2008) observaram que há um aumento da expressão de Triparredoxina após a exposição de H₂O₂, não havendo morte celular devido ao estresse induzido (Iyer *et al*, 2008). Foi demonstrada que há interação entre as proteínas Peroxirredoxina e Triparredoxina, exercendo a função de detoxificação celular, sinalização na proliferação e processos de diferenciação, além de serem cruciais na defesa do parasito contra o estresse oxidativo (Castro *et al*, 2002). Além disso, essas proteínas já foram descritas como sendo fatores de virulência em *Leishmania* (Romao *et al*, 2009). Assim, acreditamos que apesar de ambas terem sido identificadas com maior abundância nas duas cepas, não descartamos seu papel na virulência de *L. infantum*, pois em cada cepa correspondiam a *spots* diferentes, ou seja, com variação de pI e MM, e conseqüentemente apresentando funções diferentes em cada uma.

A Proteína de Choque Térmico-70 (HSP-70) desempenha um papel fundamental tanto em células em resposta a um choque térmico ou a algum estresse quanto em células em um estado nativo. Estão envolvidas com enovelamento, montagem, localização intracelular, secreção, ativação e degradação, além de interagir com vários componentes de vias de sinalização que regulam o crescimento e o desenvolvimento celular. Além disso, é demonstrado que a ausência de HSP-70, leva a uma diminuição da replicação e da virulência do parasito (Folgueira *et al*, 2008). Essa proteína interage com a proteína co-Chaperona GrpE, sendo um componente principal

do complexo PAM, um complexo necessário para a translocação de peptídeos que contêm proteínas na membrana interna da matriz mitocondrial em um modo dependente de ATP. As co-chaperonas participam da função de enovelamento das proteínas pelas Chaperonas, e algumas delas possuem a própria atividade de Chaperonas, a se julgar pela habilidade em prevenir agregação polipeptídica. Outras co-chaperonas apenas interagem com HSP-70 (mais abundante em BH400) ou HSP-90, tendo assim uma função regulatória na atividade de enovelamento de proteínas (Mayer *et al*, 2005; Zamora-Veyl *et al*, 2005; Żmijewski *et al*, 2007).

Em nossa opinião, um dos achados mais interessantes foi a abundância elevada de KMP-11 em BH400. A Proteína de Membrana de Kinetoplastídeos 11 kDa (KMP-11) é uma molécula presente na membrana de todos os protozoários da Ordem Kinetoplastida (Stebeck *et al*, 1995). Tem sido sugerido que essa proteína desempenha um papel na infectividade e virulência. Essa molécula está presente tanto em amastigota, quanto em promastigota, onde é mais expressa. Foi observado que em *L. donovani*, a expressão dessa proteína diminui em paralelo com a perda da virulência associada a várias passagens das culturas do parasito (Mukhopadhyay *et al*, 1998). Devido à super-expressão de KMP-11 realizado por Lacerda e colaboradores (2012), a virulência de *L. amazonensis* foi exacerbada. Esse dado foi comprovado após o bloqueio da KMP-11 através de anticorpos monoclonais anti-KMP-11 e posterior diminuição da virulência (Matos *et al*, 2010; Lacerda *et al*, 2012).

As proteínas Subunidade V da Citocromo C oxidase; Cofilina-like; Proteína de membrana de Kinetoplastídeos 11 kDa (KMP-11) e Proteína Rab 1 ligante à GTP não foram preditas como tendo interações com outras proteínas.

Apesar de inesperado, em ambas as cepas foram encontradas 3 proteínas com aumento de expressão (Enolase, Triparredoxina e Peroxirredoxina). Isso pode ter ocorrido devido à modificações pós-traducionais, tais como a ubiquitinação, oxidação, glicosilação, fosforilação, metilação, acetilação, dentre outras. Cada uma dessas modificações alteram a massa molecular da proteína modificada. Em alguns casos, podendo haver vários sítios dessa modificação, o que leva a uma grande alteração na massa molecular e conseqüentemente a posição do *spot* no gel (Jensen, 2006). Além disso, há mudança de funcionalidade dessa proteína ao sofrer essas modificações, podendo influenciar na diferença de virulência entre as duas cepas.

Em suma, no presente estudo foram encontradas proteínas já descritas como fatores de virulência em outras espécies de *Leishmania*, bem como algumas proteínas que são preditas como suas “parceiras”, todas identificadas simultaneamente e não isoladamente como nas citações anteriores. Certamente que isso foi em decorrência de ser um trabalho pioneiro na utilização da abordagem proteômica para identificação de fatores de virulência em *Leishmania infantum*.

Por fim, vale enfatizar ainda, que foi observado através da rede de interações que as proteínas descritas como envolvidas na virulência em *Leishmania*, muitas vezes interagem entre si, tendo todas elas sido identificadas nesse estudo, como por exemplo, a Enolase com a S-adenosil Homocisteína Hidrolase, a Triparredoxina com a Peroxirredoxina. Sabe-se que uma proteína sozinha não realiza todas suas funcionalidades e que para concluí-las, é necessário a interação com outras moléculas, tornando importante não somente o estudo das proteínas individualmente, mas as interações dos complexos protéicos globais do organismo estudado para auxiliar em um maior entendimento da biologia do parasito.

7 CONCLUSÃO

Foi observado que a cepa BH400 possui maior capacidade de infecção e carga parasitária em macrófagos infectados, quando comparado com a cepa BH46. Além disso, o aumento nos pesos dos baços e dos fígados foram maiores em animais infectados por BH400.

A avaliação Histopatológica realizada demonstrou que animais infectados pela cepa BH400 apresentaram uma inflamação granulomatosa, e os hepatócitos apresentaram degeneração hidrópica e/ou esteatose. Foi observado espessamento da cápsula reativa ao processo crônico granulomatoso. Por outro lado, os tecidos da maioria dos animais infectados pela cepa BH46 apresentaram histologia sem alterações. Através da Imuno-histoquímica, os animais infectados pela cepa BH46 apresentaram um menor parasitismo tecidual comparado aos animais infectados pela cepa BH400.

A quantificação da carga parasitária através da Diluição Sucessiva demonstrou que na cepa BH400 foi encontrado crescimento dos parasitos até a diluição 10^7 , indicando uma maior carga parasitária quando comparada com a cepa BH46. Esses dados comprovam uma maior virulência e infectividade da cepa BH400 em relação à BH46.

No presente estudo, foram encontradas proteínas já descritas como possíveis fatores de virulência em outros trabalhos, muitas vezes envolvendo outras espécies de *Leishmania*, além da *L. infantum* tais como Triparredoxina, S-adenosil Homocisteina Hidrolase, Proteína de Choque Térmico-70 (HSP-70); Metalo-Peptidase, ClanMA(E), Família M3, Enolase, Fosfomanomutase, Peroxirredoxina, Proteína 14-3-3 like, Fator de Elongação 2, Endorribonuclease L-PSP (pb5), Proteína Rab 1 ligante à GTP e Proteína de Membrana de Kinetoplastideos 11 kDa (KMP-11).

8 REFERÊNCIAS

- ACHOUR, Y.B; CHENIK, H; DELLAGI, K. Identification of a Disulfide Isomerase Protein of *Leishmania major* as a Putative Virulence Factor. *Infect. Immun.* V.70, p.3576, 2002.
- ALBRECHT, D.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A.; GUTHKE, R.; Missing values in gel-based proteomics. *Proteomics*, p.1202-1211, 2010.
- ANDERSEN, J.S.; MANN, M. Functional genomics by mass spectrometry. *FEBS Lett*, v.480, p.25-31. 2000.
- ANDERSON, L.; SEILHAMER, J.A. comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, v.18, p.533-7, 1997.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.*v.37, p.1097-106, 2007.
- BARGIS-SURGEY, P; LAVERGNE, J-P; REBOUD, J-P. Interaction of elongation factor eEF-2 with ribosomal P proteins. *Eur. J. Biochem.* v. 262, p. 606-611, 1999.
- BEATTIE, L.; EVANS, K.J.; KAYE, P.M.; SMITH, D.F. Transgenic *Leishmania* and the immune response to infection. *Parasite Immunology*, v.30, p.255-66, 2008.
- BEN ACHOUR, Y.; CHENIK, M. Identification of a disulfide isomerase protein of *Leishmania major* as a putative virulence factor. *Infection and Immunity*, v.70. p. 3576-3585. 2002.
- BERKELMAN, T.; STENSTED. 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. T2004 *GE Healthcare*, Edition AC (80-6429-60).
- BLACKWELL, J.M.; FAKIOLA, M.; IBRAHIM, M.E.; JAMIESON, S.E.; JERONIMO, S.B. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunology*, v.31, p.254-266, 2009.
- BRITTINGHAM, A.; MILLER, MA.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.112, p.51-59. 2001.
- BROBEY, R.K; SOONG, L. Establishing a liquid-phase IEF in combination with 2-DE for the analysis of *Leishmania* proteins. *Proteomics* v.7 p.116-120, 2007.
- BROTHERTON, M.C; RACINE, G; FOUCHER, A.L; PAPADOPOULOU, B; OUELLETTE, M. Analysis of Stage-Specific Expression of Basic Proteins in *Leishmania infantum*. *J. Proteome Research*. v.9, p.3842-3853, 2010.

CAIAFFA, W.; ALMEIDA, M.; OLIVEIRA, C. The urban environment from the health perspective: the case of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Cadernos de saúde pública*, v.17. p.958-967. 2001.

CAO, Z.; HAN, Z.; SHAO, Y.; LIU, X.; WANGLIU, S. Proteomics analysis of differentially expressed proteins in chicken trachea and kidney after infection with the highly virulent and attenuated coronavirus infectious bronchitis virus in vivo. *Proteome Science*, v.10, n.24, 2012.

CARVALHO, L.P.; PASSOS, S.; DUTRA, W.O.; SOTO, M.; ALONSO, C.; GOLLOB, K.J.; CARVALHO, E.M.; RIBEIRO DE JESUS, A. Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol*, v.61, p.337–342, 2005.

CASTELLANO, L.R. Resposta immune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. *Vitae academia biomédica digital*, v.25. 2005.

CASTRO, H; SOUSA, C; SANTOS, M; TOMAS, A. M. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and Mitochondrial peroxiredoxins in *leishmania infantum*. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 33, n. 11, p. 1552–1562, 2002.

CHANG, K.P.; BRADFORD, S. Molecular determinants and regulations of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biology and Disease*, v.1. p.1-7. 2002.

CHANG, J. Comparative proteomics: characterization of a two-dimensional gel electrophoresis system to study the effect of aging on mitochondrial proteins. *Mech. Ageing Dev*, v.124, p.33-41. 2003.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v.5, p.873-882. 2007.

CHAWLA, B.; JHINGRAN, A.; MADHUBALA, R. Paromomycin Affects Translation and Vesicle-Mediated Trafficking as Revealed by Proteomics of Paromomycin – Susceptible –resistant *Leishmania donovani*. *PLoS ONE*, v.6, p.1-12, 2011.

CHOUDHURY, R.; DAS, P.; BHAUMIK, S.K.; DE, T.; CHAKRABORTI, T. *In situ* immunolocalization and stage-dependent expression of a secretoryserine protease in *Leishmania donovani* and its role as a vaccine candidate. *Clin Vaccine Immunol*, v.17, p.660–667, 2010.

CLAYTON, C.E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again *Embo J*, v.21 p.1881–8, 2002.

COSTA, M.M.; ANDRADE. H.M; BARTHOLOMEU, D.C; PIRES, S.F; CHAPEAUROUGE, A.D; GAZZINELLI, R.T. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: Identification of Novel Candidate Antigens for Diagnostic Tests and Vaccine. *J. Proteome Res.* V.10, p.2172–2184, 2011.

CUERVO, P.; JESUS, J.B.; JUNQUEIRA, M.; MENDONÇA-LIMA, L.; GONZÁLEZ, L.J. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular & Biochemical Parasitology*. V.154, p.6-21. 2007.

CUERVO, P, DE JESUS, JB, SABOIA-VAHIA, L, MENDONCA-LIMA, L, DOMONT, GB, CUPOLILLO, E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *J Proteomics*, v.73, p. 79–92, 2009.

CUERVO, P. DOMONT, G.B.; DE JESUS, J.B. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics*, v.73, p.845-867, 2010.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*.v.72, p.132-141, 2002.

DE ASSIS, R.R.; IBRAIM, I.C.; NOGUEIRA, P.M.; SOARES, R.P.; TURCO, S.J. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011.

DOUGHERTY, M.K.; MORRISON, D.K. Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci*, v.117, p.1875–1884, 2004.

GONTIJO, C. MELO, M. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v.7, p.338-349, 2004.

DEA-AYUELA, M.A.; GUTIERREZ, L.O.; FERNANDEZ, F. Changes in the proteome and infectivity of *Leishmania infantum* induced by in vitro exposure to a nitric oxide donor. *International Journal of Medical Microbiology*, v.299, p.221–232, 2009.

DENISE, H.; POOT, J.; JIMÉNEZ, M.; AMBIT, A.; HERRMANN, D.C.; VERMEULEN, A.N.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. *BMC Mol Biol*, v.13, n.42, 2006.

EL FAKHRY, Y.; OUELLETTE, M., PAPADOPOULOU, B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, v.2, p.1007–1017, 2002.

FARRELL, J.P. *Leishmania donovani*: acquired resistance to visceral leishmaniasis in the golden hamster. *Exp Parasitol*, v.40, p.89–94, 1976.

FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, v.246 p.64–71, 1989.

FOLGUEIRA, C.; CARRIÓN, J.; MORENO, J.; SAUGAR, J.M.; CAÑAVATE, C. REQUENA, J.M. Effects of the disruption of the HSP70-II gene on the growth, morphology, and virulence of *Leishmania infantum* promastigotes. *Int. Microbiol*, v.11, p.81-89, 2008.

FORGBER M, BASU R, ROYCHOUDHURY K, *et al.* Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology. *PLoS One*, v.40, 2006.

FOUCHER AL, PAPADOPOULOU B, OUELLETTE M. Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of *Leishmania infantum*. *J Proteome Res*, v.7, p. 1741–50, 2006.

GANNAVARAN, S; DEBRABANT, A. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. *Front Cell Infect Microbiol* v.2, 2012.

GIFAWESEN, C.; FARRELL, J.P. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. *Infect Immun* v.57, p.3091–3096, 1989.

GOMEZ, M.A.; CONTRERAS, I.; HALLÉ, M.; TREMBLAY, M.L.; MCMASTER, R.W.; OLIVIER, M. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal*, v.2, n.58, 2009.

GÖRG, A.; WEISS, W. GÜNTHER, S. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, v.4, p.3665–3685, 2004.

GÖRG, A.; KLAUS, A.; LÜCK, C.; WEILAND, F.; WEISS, W. Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis. *Technische Universität München*, 2007.

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, v.19, p.1720–30, 1999.

HEIKKILA, T.; THIRUMALAIRAJAN, S.; DAVIES, M. The first de novo designed inhibitors of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. *Bioorg Med Chem Lett*, v.16, p.88–92, 2006.

HERTZ-FOWLER, C.; PEACOCK, C.S.; WOOD, V. GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic Acids Res*, v.32, p.339–43, 2004.

HSIAO, C.H.; YAO, C.; STORLIE, P.; DONELSON, JE.; WILSON, M.E.; The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.157, p.148-159, 2008.

ILG, T.; MONTGOMERY, J.; STIERHOF, Y.D.; HANDMAN, E. Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania major* gene ppg1, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem*, v.274, p.31410–31420, 1999.

- ILG, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitol Today*, v.16, p.489–497, 2000.
- IVENS, A.C.; PEACOCK, C.S.; WORTHEY, E.A. The genome of the kinetoplastid parasite. *Leishmania major*. *Science*, v.309, p.436–42, 2005.
- IYER, J.P.; KAPRAKKADEN, A.; CHOUDHARY, M.L.; SHAHA, C. Crucial role of cytosolic trypanothione peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Molecular Microbiology* v.68, p.372–391, 2008.
- JAIN, R.; GHOSHAL, A.; MANDAL, C.; SHAHA, C. *Leishmania* cell surface prohibitin: role in host-parasite interaction. *Cell Microbiol*, v.12, p.432–452, 2010.
- JARDIM, A.; FUNK, V.; CAPRIOLI, R.M.; OLAFSON, R.W. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem J*, v.305, p.307–313, 1995.
- JENSEN, O.N. Interpreting the protein language using proteomics. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, v.7, 2006.
- KADENBACH, B, ARNOLD S, LEE I, HÜTTEMANN, M. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*.v.12, p. 400-8, 2004.
- KARAS, M.; BACHMANN, D.; BAHR, U.; HILLENKAMP, F.; Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, v.78, p.53–68, 1987.
- KEDZIERSKI, L; MALBY, R; SMITH, B; HANDMAN, E. Structure of *Leishmania Mexicana* Phosphomannomutase Highlights Similarities with Human Isoforms. *J. Mol. Biol.* v.363, p.215–227, 2006.
- KUSHAWAHA, R.; GUPTA, AMOGH, A.; SAHASRABUDDHE, S. Elongation factor-2, a Th1 stimulatory protein of *Leishmania donovani*, generates strong IFN- γ and IL-12 response in cured *Leishmania*-infected patients/hamsters and protects hamsters against *Leishmania* challenge. *J Immunol*,v.187,p.6417-6427,2011.
- LACERDA, DI.; LÉA NUNES, MP. Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.107, p.238-245, 2012.
- LAISON, R.; SHAW, J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis.. *Biology of the Kinetoplastida*.Academic Press, v.1, p.1-120, 1979.
- LAISON, R.; SHAW, J. Evolution, classification and geographical distribution. The Leishmaniasis in Biology and medicine. *London*. v.1, p.1-120, 1987.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Princípios de Bioquímica. *Sarvier*, 2002.

LEIFSO, K.; COHEN-FREUE, G.; DOGRA, G.; MURRAY, A.; MCMASTER, W.R. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Molecular & Biochemical Parasitology*, V.152, p.35–46, 2007.

LIEKE, T.; NYLÉN, S.; EIDSMO, L.; MCMASTER, W.R.; MOHAMMADI, A.M.; KHAMESIPOUR, A.; BERG, L.; AKUFFO, H. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol*, v.153, p.221–230, 2008.

MALYGIN, A.A.; SHAULO, D.D.; KARPOVA, G. Proteins S7, S10, S16 and S19 of the human 40S ribosomal subunit are most resistant to dissociation by salt. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1494, p.213-216, 2000.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* v.62, 2005.

MATLASHEWSKI, G. *Leishmania* infection and virulence. *Medical Microbiology and Immunology*, v.190, p.37-42, 2001.

MATOS, D; FACCIOLI, L; MENDONÇA, S. Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 341-347, 2010.

MCKERROW, J.H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P.; SAJID, M. Proteases in parasitic diseases. *Ann Rev Pathol*, v.1, p.497–536, 2006.

MCNICOLL, F.; DRUMMELSMITH, J.; MÜLLER, M.; MADORE, E.; BOILARD, N.; OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, v.6, p.3567-3581, 2006.

MOJTAHEDI, Z; CLOS, J; KAMALI-SARVESTANI, E. *Leishmania major*: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Experimental Parasitology* v.119, p. 422–429, 2008.

MORALES, M.A.; WATANABE, R.; DACHER, M.; CHAFEY, P.; OSORIO, Y.; FORTÉA, J.; SCOTT, D.A.; BEVERLEY, S.M.; OMMEN, G.; CLOS, J.; HEM, S.; LENORMAND, P.; ROUSSELLE, J.C.; NAMANE, A.; SPÄTH, G.F. Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *PNAS*, v.107, n.18, 2010.

MOTTRAM, J.C.; BROOKS, D.R.; COOMBS, G.H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host–parasite interactions. *Curr Opin Microbiol*, v.1, p.455–60, 1998.

MUKHOPADHYAY, S.; SEN, P.; MAJUMDER, H.K.; ROY, S. Reduced expression of lipophosphoglycan (LPG) and kinetoplastid membrane protein (KMP)-11 in

- Leishmania donovani* promastigotes in axenic culture. *J Parasitol*, v.84, p.644-647, 1998.
- MUNDODI, V.; KUCKNOOR, A.S.; GEDAMU, L. Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. *BMC Mol Biol*, v.6, n. 3, 2005.
- NEUBER, H. Leishmaniasis. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v.6, p.754-764, 2008.
- NEVES, DP.; LINARDI, P.M.; MELO, A.L. Parasitologia Humana. *Atheneu*, 11^a Ed. 2005.
- NUGENT, P.G.; KARSANI, S.A.; WAIT, R.; TEMPERO, J.; SMITH, D.F. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol Biochem Parasitol*, v.136, p.51–62, 2004.
- O' FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem*, v.250, p.4007-4021, 1975.
- OLIVEIRA, D.; GOUVEIA, J.J.; DINIZ, N.; PACHECO, A.C. Pathogenomics Analysis of *Leishmania* spp.: Flagellar Gene Families of Putative Virulence Factors. *Journal of Integrative Biology*, v.9, p.173-193, 2008.
- OTT, K.J.; HANSON, W.L.; STAUBER, L. Course of infection of *Leishmania donovani* in hamsters inoculated by the intraperitoneal route. *J Parasitol*, v.53, p.641–645, 1967.
- OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drugs Resist Updat*, v.7 n.4-5, p.257-266, 2004.
- PAAPE, D; AEBISCHER, T. Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. *Journal of Proteomics*.P.1614-1624, 2011.
- PANCHOLI V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci*. v.58 p.902-20, 2001.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, v.405, p.837-846, 2000.
- PATTON, W.F Detection technologies in proteome analysis. *J. Chromatography*, v.771, p.3-31, 2002.
- PEACOCK, C.S.; SEEGER, K. HARRIS, D. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*, v.39, p.839–47, 2007.
- PEARSON, R.D.; COX, G.; JERONIMO, S.M.B.; CASTRACANE, J.; DREW, J.S.; EVANS, T. Visceral leishmaniasis: A model for infection-induced cachexia. *Amer J Trop Med Hyg*, v.47, p.8-15, 1992.

PEREIRA, A.S. Challenges of Analytical chemistry in face of the needs of the pharmaceutical industry. *Química Nova*, v.28, p.107-111, 2005.

PESCHER, P.; BLISNICK, T.; BASTIN, P.; SPÄTH, G. Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. *Cellular Microbiology*, v.13, p.978-991, 2011.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M.P.; GERMAIN, R.N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v.322, p.1634-1634, 2008.

POOT, J.; DENISE, H.; HERRMANN, D.C.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; VERMEULEN, A.N. Virulence and protective potential of several Cysteine peptidase knockout strains of *Leishmania infantum* in hamsters. In Experimental challenge models for canine leishmaniasis in hamsters and dogs, optimization and application in vaccine research. *Netherlands: Utrecht University press*; p.93–107, 2006.

PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, C.A.; LIEW, F.Y. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*, v.25 p.745–750, 1995.

REGIDOR-CERRILLO, J.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; PASTOR-FERNÁNDEZ, I.; ORTEGA-MORA, L.M. Proteome expression changes among virulent and attenuated *Neospora caninum* isolates. *Journal of Proteomics*, v.75, p.2306-2318, 2012.

RIÇA-CAPELA, M.J.; CORTES, S.; LEANDRO, C.; PELETEIRO, M.C.; CAMPINO, L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitology Research*, v.89, p.163-169, 2003.

RODRIGUES, V.J.R.; SANTANA DA SILVA, J.; CAMPOS-NETO, A. Selective inability of spleen antigen presenting cells from *Leishmania donovani* infected hamsters to mediate specific T cell proliferation to parasite antigens. *Parasite Immunol*, v.14, p.49–58, 1992.

ROMAO, S.; CASTRO, H.; SOUSA, C.; CARVALHO, S.; TOMÁS, A. The cytosolic trypanothione of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival. *International Journal for Parasitology*, 2009.

ROSENZWEIG, D.; SMITH, D.; OPPERDOES, F.; STERN, S.; OLAFSON, R.W.; ZILBERSTEIN, D. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *The FASEB Journal*, v.22, 2008.

SAJID, M.; MCKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*, v.120, p.1–21, 2001.

SACKS D, NOBEN-TRAUTH N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* V. 2 n.11, p.845-58, 2002.

SCHLAGENHAUF, E.; ETGES, R.; METCALF, P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure*, v.6, p.1035–1046, 1998.

SILVA-ALMEIDA, M.; PEREIRA, B.A.; ALVES, C.R. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasites & Vectors*, v.5, n.160, 2012.

SILVEIRA, F.; LAISON, R.; CORBETT, C. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 239-251, 2004.

SILVERMAN, J.M.; CHAN, S.K.; ROBINSON, D.P.; DWYER, D.M.; Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol*, v.9, 2008.

SOMANNA, A.; MUNDODI, V.; GEDAMU, L. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. *J Biol Chem*, v.277, p. 25305–25312, 2002.

SOUZA, C.M. As leishmanioses no município de Belo Horizonte: estudos entomológicos e biogeográficos visando à vigilância epidemiológica [Tese de doutorado]. Belo Horizonte: Instituto Oswaldo Cruz; 2005.

SPATH, G.F.; GARRAWAY, L.A.; TURCO, S.J.; BEVERLEY, S.M. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, p.9536-9541, 2003.

STEBECK, C.E.; BEECROFT, R.P.; SINGH, B.N.; JARDIM, A.; OLAFSON, R.W.; TUCKEY, C.; PRENEVOST, K.D.; PEARSON, T.W. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Mol Biochem Parasitol*, v.71, p.1-13, 1995

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, v.118, n.4, 2008.

SURESH, S. Proteomic resources: integrating biomedical information in humans. *Gene*, v.364, p.13-18, 2005.

SVÁROVSKÁ, A.; ANT, TH.; SEBLOVÁ, V.; JECNÁ, L.; BEVERLEY, S.M.; VOLF, P. *Leishmania major* glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. *PLoS Negl Trop Dis*, v.4, n.580, 2010.

SWENERTON, RK, ZHANG, S, SAJID, M, MEDZIHRADESKY, KF, CRAIK, CS, KELLY, BL, MCKERROW, JH. The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem*. v.286, p.429-40, 2011.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*, v.292, p.17-23, 2004.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, v.8 p.151-3, 1988.

VANEGAS, G.; QUIÑONES, W.; CONCEPCIÓN, L.; AVILÁN, L. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res*, v.101, p.1511-1516, 2007.

VERGNES B, GOUBAL B, GIRARD I, SUNDAR S, DRUMMELSMITH J, OUELLETTE M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics*, v.6, p. 88-101, 2007.

VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H.; D'ÁVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, A.L.S.; DIAS, E.P.S.; MELO, A.C.N. Biological Roles of Peptidases in Trypanosomatids. *Open Parasitol J*, v.4, p.5-23, 2010.

VICKERS, T.J.; WYLIE, S.H.; FAIRLAMB, A.H. *Leishmania major* elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity. *J Biol Chem*, v.279, 2004.

VISWANATHAN, S.; UNLÜ, M.; MINDEN, J.S. Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat Protoc*. v.1, p.1351-8, 2006.

WALKER, J.; VASQUEZ, J.J.; GOMEZ, M.A. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, v.147, p.64-73, 2006.

WALKER, J.; ACESTOR, N.; GONGORA, R.; QUADRONI, M.; SEGURA, I.; FASEL, N. Comparative protein profiling identifies elongation factor-1beta and tryparedoxin peroxidase as factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. *Mol Biochem Parasitol*, v.145, p.254-64, 2006.

WESTERMEIER, R.; MAROUGA, R. Protein Detection methods in proteomics research. *Biosci.Rep*, v.25, p.19-32, 2005.

WILKINS, M.R.; PASQUALI, C. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*, v.14, p.61-66, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Magnitude of the problem. Disponível em: <who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html>. Acesso em: 30 set. 2009.

WYLLIE, S.; VICKERS, T.J.; FAIRLAMB, A.H. Roles of trypanothioneS-transferase and tryparedoxin peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother*; v.52, p.1359–65, 2008.

XIAO, S; WANG, Q, JIA, J; CHEN, Y. Proteome changes of lungs artificially infected with H-PRRSV and N-PRRSV by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. *Virology Journal*, v.7, 2010.

XIE, J.; TECHRITZ, S.; HAEBEL, S.; HORN, A. A two-dimensional electrophoretic map of human mitochondrial proteins from immortalized lymphoblastoid cell lines: a prerequisite to study mitochondrial disorders in patients. *Proteomics*, v.5, p.2981–2999, 2005.

YAO, C.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol*, v.132, p.1–16, 2003.

YAO, C.; LUO, J.; STORLIE, P.; DONELSON, J.E. Multiple products of the *Leishmania chagasi* major surface protease (MSP or GP63) gene family. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.135, p.171-183, 2004.

YAO, C.; DONELSON, J.E. Internal and Surface-Localized Major Surface Proteases of *Leishmania* spp. and Their Differential Release from Promastigote. *Eukaryotic Cell*, v.6, p.1905–1912, 2007.

YAO, C. Major Surface Protease of Trypanosomatids: One Size Fits All? *Infect Immun*, v.78, p.22–31, 2010.


ZAMORA-VEYL, F.B.; KROEMER, M.; ZANDER, D.; CLOS, J. Stage-specific expression of the mitochondrial co-chaperonin of *Leishmania donovani*, CPN10. *Kinetoplastid Biology and Disease* v.4, n.3, 2005.

ZHANG, W.W.; PEACOCK, C.S.; MATLASHEWSKI, G. A genomic-based approach combining *in vivo* selection in mice to identify a novel virulence gene in *Leishmania*. *Plos Neglected tropical diseases*, v.2, e248. 2008.

ZUFFEREY, R.; ALLEN, S.; BARRON, T.; SULLIVAN, D.R.; DENNY, P.W.; ALMEIDA, I.C.; SMITH, D.F.; TURCO, S.J.; FERGUSON, M.A.; BEVERLEY, S.M. Ether phospholipids and glycosylinositol phospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*. *J Biol Chem*, v.278, p.44708–44718, 2003.

9. ANEXOS

Anexo 1 - Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do protocolo experimental usado (CETEA – Protocolo 232/2010).



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 232/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Abordagem proteômica para identificação de fatores de virulência em *Leishmania Chagasi***", que tem como responsável(is) **Hélida Monteiro de Andrade**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **1/ 12/2010**.

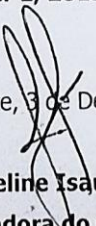
Este certificado expira-se em **1/ 12/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 232/2010**, related to the project entitled "***Leishmaniaa Chagasi* virulence factors identification by proteomic approach**", under the supervisors of **Hélida Monteiro de Andrade**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 1, 2010**.

This certificate expires in **December 1, 2015**.

Belo Horizonte, 3 de Dezembro de 2010.


Prof.ª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

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

Anexo 2 - Identificação das proteínas diferencialmente expressas entre BH400 e BH46 de *L. infantum*. Sequência dos peptídeos confirmados no MALDI ToF/ToF; a função molecular através da consulta no banco de dados UniProt.org; a área de cobertura necessária para que a proteína pudesse ser encontrada no banco de dados; o *score* da proteína.

Nº Spot	Nome da Proteína (pI/Mr exp - pred)	GI	Sequência de Peptídeos Identificados (Da)	Função biológica (UniProt)	Cobertura %	Protein Score*	Abundance Vol. Ratio p < 0,05
B.401	soluble promastigote surface antigen PSA-34S (4.2/53.00 - 4.72/35.55)	gi 264665718	R.IVSLSGNHFCGCVPSWR.E (2091.05)		5	59	↑ BH400
B.402	beta-tubulin (4.4/58.00 - 4.69/50.30)	gi 1296832	K.LAVNLVPFPR.L (1124.78) R.FPQLNSDLR.K (1145.70) R.INVYFDESAGGR.Y (1326.77)	nucleotide/nucleoside/nucleobase binding assembly of protein complexes microtubule cytoskeleton	7	149	↑ BH400
B.409	metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3 (5.77/64.00 - 5.61/77.68)	gi 401423944	K.VFALDLFEYIR.S (1385.14) R.DSLNTTQLFYDLEPR.V (1811.42)	Metalloprotease; protease; proteólises; hydrolase; metal ion binding; metalloendopeptidase activity.	3	80	↑ BH400
B.414	Enolase (5.86/54.00 - 5.33/46.63)	gi 146081643	K.AQIVGDDTLVTNVER.V (1629.10) R.GNPTVEVELMTEAGVFR.S (1855.22) K.NPEPTYVSAELQATYER.W (2038.31)	glycolysis; phosphopyruvate hydratase complex; magnesium ion binding; virulence	11	178	↑ BH400
B.415	S-adenosylhomocysteine hydrolase (5.84/55.00 - 5.66/48.52)	gi 401420516	R.GDNAGVFFLPK.S (1163.97) K.EHVEIKPQVDR.Y (1349.14) K.QAEYINCPVNGPFKPDHYR.Y (2305.77)	Adenosylhomocysteine is a competitive inhibitor of S-adenosyl-L-methionine-dependent methyl transferase reactions; therefore adenosylhomocysteinase may play a key role in the control of methylations via regulation of the intracellular concentration of adenosylhomocysteine.	9	124	↑ BH400
B.417	putative vacuolar ATP synthase subunit b (5.90/57.00 - 5.81/55.89)	gi 146092411	R.NIEGIPINPR.A (1121.90)	hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances; ATP binding; hydrogen ion transporting ATP synthase activity, rotational mechanism;	2	52	↑ BH400

B.420	putative vacuolar ATP synthase subunit b (6.03/57.00 - 5.81/55.89)	gi 146092411	R.NIEGIPINPR.A (1121.72) R.QLYPPINILPSLSR.L (1611.04) R.IFNGSGIPIDNGPPVLPEQFR.N (2267.35)	hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances; ATP binding; hydrogen ion transporting ATP synthase activity, rotational mechanism;	9	133	↑ BH400
B.424	heat-shock protein 70 (5.01/51.00 - 5.31/50.51)	gi 365927246	R.FEELCGDLFR.G (1284.97) K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1964.87)	response to stress; ATP binding;	6	73	↑ BH400
B.425	heat-shock protein 70 (5.12/50.00 - 5.31/50.51)	gi 365927246	R.SVHDVVLVGGSTR.I (1325.07) K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G (1964.86)	response to stress; ATP binding;	6	111	↑ BH400
B.442	putative reiske iron-sulfur protein precursor (5.57/44.00 - 5.91/34.04)	gi 339899227	R_2QGPAPLNLEVPPYR.W + Gln->pyro-Glu (N-term Q) (1532.89) K.DYDASMWDEEFFR.K (1709.77)	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity; metal ion binding.	9	118	↑ BH400
B.444	elongation factor 2 (6.24/41.00 - 5.77/94.94)	gi 146103554	K.DSFVAAWQWATR.E (1436.95) R.AYLPVAESFGFTADLR.A (1756.23) R.GVIIGEENRPGTPIYNVR.A (1983.48)	Elongation factor; translation elongation factor 1 complex; GTP catabolic process; GTPase activity	5	147	↑ BH400
B.445	14-3-3 protein-like protein (4.68/38.00 - 4.79/29.78)	gi 146104107	R.FDEMLLCIR.K (1195.70) R.YYAEIDSGDGQR.Q (1372.75) K.ATDVANSSLAPTHPIR.L (1649.11)	binding to numerous phosphorylated proteins including transcription factors, biosynthetic enzymes, cytoskeletal proteins, signaling molecules and display important anti-apoptotic characteristics	14	182	↑ BH400
B.446	conserved hypothetical protein (5.04/37.00 - 5.37/29.14)	gi 401421092	K_EMQASGEVDYTTIPPR.L + Glu->pyro-Glu (N-term E); Oxidation (M) (1890.21) R.SIVEGFAVDVQGSYVNEAVGR.E (2195.44)		14	134	↑ BH400
B.447	putative phosphomannomutase (5.18/36.00 - 5.18/28.23)	gi 401420112	R.NGMFNVSPIGR.N + Oxidation (M) (1207.70) K.AILLFDVDGTLTPPR.N (1627.07) K.TSEGGNDYEIFTDSR.T (1689.91)	mannose biosynthetic process; phosphomannomutase activity	16	166	↑ BH400
B.448	heat shock protein 70 (5.27/37.00 - 6.25/56.63)	gi 316936317	K.DAGTISGLEVLR.I (1229.77) R.LVTFFTEEFK.R (1257.78) K.GDDKPVISVQYR.G (1375.84) R.LVTFFTEEFKR.K (1415.86) R.TTPSYVAFTDSER.L (1472.81)	response to stress; ATP binding;	15	525	↑ BH400

			K.AVVTVPAYFNDSQR.Q (1565.91) K.AVVTVPAYFNDSQR.Q (1566.96) K.ATNGDTHLGGEDFDNR.L (1718.92)				
B.449	putative phosphomannomutase (5.32/36.00 - 5.18/28.23)	gi 401420112	R.NGMFNVSPIGR.N + Oxidation (M) (1207.70) K.AILLFDVDGTLTPPR.N (1626.98) K.TSEGGNDYEIFTDSR.T (1690.00)	mannose biosynthetic process; phosphomannomutase activity	16	214	↑ BH400
B.450	heat-shock protein (5.50/38.00 - 5.41/71.40)	gi 758136	R.TTPSYVAFTDSER.L (1472.97) K.AVVTVPAYFNDSQR.Q (1566.18) K.AVVTVPAYFNDSQR.Q (1567.09) K.ATNGDTHLGGEDFDNR.L (1719.14)	response to stress; ATP binding.	6	131	↑ BH400
B.453	putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase (5.68/36.00 - 5.80/30.72)	gi 146089119	K.KHDVILGLFLFGTDR.V (1730.17)	carbon-carbon lyase activity; cellular aromatic compound metabolic process	5	74	↑ BH400
B.455	putative proteasome alpha 2 subunit (5.44/33.00 - 5.43/25.36)	gi 154337338	R.FEILSVDQLR.D (1218.86) K.VFVLDEHAGCTYSGMGPDCR.V + Oxidation (M) (2298.49)	ubiquitin-dependent protein catabolic process; proteasome core complex, alpha-subunit complex; threonine-type endopeptidase activity	12	81	↑ BH400
B.458	Peroxidoxin (5.91/33.00 - 6.90/25.58)	gi 401422277	R.HATINDLPVGR.N (1191.83) R.DYGV LIEESGIALR.G (1534.07)	antioxidant activity; peroxiredoxin activity	11	112	↑ BH400
B.459	cytoplasmic trypanredoxin peroxidase (6.24/33.00 - 6.73/22.37)	gi 145411494	R ₂ QITVNDMPVGR.N + Gln->pyro-Glu (N-term Q) (1211.94) R.LLEAFQFVEK.H (1222.97) R.AYGVLAEAQGVAYR.G (1467.14)	peroxidase activity; Oxidoreductase	17	197	↑ BH400
B.460	putative small GTP-binding protein Rab1 (5.38/31.00 - 5.55/22.46)	gi 339898641	K.LRIYDTAGQER.F (1315.93)	small GTPase mediated signal transduction; GTP binding; protein transport	5	53	↑ BH400
B.461	Peroxidoxin (5.59/32.00 - 6.90/ 25.58)	gi 401422277	R.HATINDLPVGR.N (1192.03) R.DYGV LIEESGIALR.G (1534.27) R.NTQVIAVSCDSVYSHLAWVNTPR.K (2618.11)	antioxidant activity; peroxiredoxin activity	21	235	↑ BH400

B.462	putative cytochrome c oxidase subunit V (5.64/31.00 - 6.10/22.38)	gi 146089942	R.VFLPPLGDPHR.L (1383.90) R.GAEIPDHVVFQTPAVIER.L (1878.20)	cytochrome-c oxidase activity; Oxidoreductase.	14	127	↑ BH400
B.464	cytoplasmic trypanredoxin peroxidase (6.21/29.00 - 6.73/22.37)	gi 145411494	R.AYGVLAEAQGVAYR.G (1466.88)	peroxidase activity; Oxidoreductase	7	111	↑ BH400
B.469	putative endoribonuclease L-PSP (pb5) (5.45/19.00 - 5.87/17.30)	gi 146087017	K.SCAVQLIAQIK.A (1229.89)	Nuclease, mRNA cleavage	6	67	↑ BH400
B.470	putative endoribonuclease L-PSP (pb5) (5.83/19.00 - 5.87/17.30)	gi 146087017	K.SCAVQLIAQIK.A (1229.86) K.LMVGQLGDSLTAEDGK.A (1633.18) K.LMVGQLGDSLTAEDGK.A + Oxidation (M) (1649.17)	Nuclease, mRNA cleavage	16	134	↑ BH400
B.471	putative small myristoylated protein-1 (4.95/16.00 - 5.31/15.15)	gi 146085415	K.MDALPLSEEYR.Q + Oxidation (M) (1338.75)		8	47	↑ BH400
B.473	cytosolic trypanredoxin (5.52/17.00 - 5.23/16.68)	gi 157781821	K.MPWLALPFEK.R (1230.72) K.MPWLALPFEK.R + Oxidation (M) (1246.73) R.GFTPQLVEFYDK.H (1442.82) R.HALTQDPEGAQFPWR.D (1751.99) R.HALTQDPEGAQFPWR.D (1753.98) R.HALTQDPEGAQFPWRDE.- (1998.08)	peroxiredoxin activity; Oxidoreductase	26	251	↑ BH400
B.475	cofilin-like protein (5.44/16.00 - 5.30/15.85)	gi 401416034	R.DALSAVSEGYLPIQANDESGLDAAEEIVR.K (2961.43)		20	96	↑ BH400
B.477	kinetoplastid membrane protein-11 (5.98/11.00 - 5.96/11.28)	gi 146101120	K.LDRLDEEFNR.K (1305.88)	positive regulation of T-cell proliferation; cytoskeleton organization; parasite mobility and attachment to the surface of the host cell;	10	60	↑ BH400
B.478	putative glutamine synthetase (6.11/50.00 - 5.71/42.89)	gi 401415106	K.DIIFYGSENNKR.L (1455.94) R.AENGLVVIHQYIDR.L (1657.08)	glutamine biosynthetic process; nitrogen compound metabolic process; glutamate-ammonia ligase activity	6	64	↑ BH400
A.7	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor (5.07/62.00 -)	gi 146104321	K.DPFENMGAQLVR.Q (1375.52) R.AAVQEGIVAGGGTALLR.A (1581.75) R.YVNMFEAGIIDPTR.V (1624.66)	response to stress; protein refolding;	10	209	↑ BH46

	5.33/59.66)		K.IQSIHSLLPALNHVVR.S (1795.85)				
A.8	chaperonin HSP60 (5.26/63.00 - 5.33/ 60.85)	gi 146104317	R.AAVQEGIVAGGGTALLR.A (1581.69)	response to stress; protein refolding;	3	52	↑ BH46
A.10	putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor (5.53/63.00 - 5.80/ 72.08)	gi 146093966	K.DAGTIAGLNVIR.V (1198.59) K_EINDVVLVGGMTR.M + Glu->pyro-Glu (N- term E) (1383.60) K.EINDVVLVGGMTR.M (1401.62) R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G (1878.85) K.VSNAVVTCPAYFNDAQR.Q (1906.85) K.VSNAVVTCPAYFNDAQR.Q (1911.73)	protein folding; response to stress; ATP binding.	9	267	↑ BH46
A.11	putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor (5.62/64.00 - 6.00/ 69.31)	gi 146093964	K_EINDVVLVGGMTR.M + Glu->pyro-Glu (N- term E) (1376.48) K_EINDVVLVGGMTR.M + Glu->pyro-Glu (N- term E) (1383.53) K.EINDVVLVGGMTR.M + Oxidation (M) (1417.52) R.GVNPDEAVALGAATLGGVLR.G (1878.75) K.VSNAVVTCPAYFNDAQR.Q (1911.61)	protein folding; response to stress; ATP binding.	7	174	↑ BH46
A.14	Enolase (5.64/58.00 - 5.33/ 46.63)	gi 146081643	K.AQIVGDDLTVTNVER.V (1628.65) R.SAVPSGASTGVHEACELR.D (1826.64) R.GNPTVEVELMTEAGVFR.S + Oxidation (M) (1854.65) K.NPEPTYVSAELQATYER.W (2037.70)	glycolysis; phosphopyruvate hydratase complex; magnesium ion binding; virulence.	15	195	↑ BH46
A.20	putative eukaryotic initiation factor 4a (6.24/56.00 - 5.83/ 45.35)	gi 146075141	K.TGAFSIGLLQR.L (1161.42) K.FCETFVGGTR.V (1172.30)	translation initiation factor activity; DNA binding; RNA metabolic process.	5	87	↑ BH46
A.23	Actin (5.64/54.00 - 5.41/ 42.30)	gi 146076586	K.IWHHTFYNELR.V (1514.81)	cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells; cytoskeleton;	2	80	↑ BH46

				ATP binding			
A.25	alpha tubulin (6.00/55.00 - 5.08/ 54.94)	gi 339897551	R.QLFNPEQLVSGK.E (1358.69) R.SLDIERPSYTNVNR.L (1662.87)	GTPase activity; GTP binding; structural molecule activity; major constituent of microtubules.	5	104	↑ BH46
A.27	alpha tubulin (5.43/48.00 - 5.08/ 54.94)	gi 339897551	R.QLFNPEQLVSGK.E (1358.64) R.LIGQVSSLTASLR.F (1442.83) R.SLDIERPSYTNVNR.L (1662.85) R.IHFVLTSYAPVVSAEK.A (1759.90) R.CIFLDLEPTVVDEV.R.T (1803.88)	GTPase activity; GTP binding; structural molecule activity; major constituent of microtubules.	14	294	↑ BH46
A.28	conserved hypothetical protein (5.46/49.00 - 5.32/ 41.15)	gi 146094146	R.YTGDWTFGR.I (1101.54) R.YEGDWLDDR.R (1167.56)		5	58	↑ BH46
A.30	protein disulfide isomerase (5.58/51.00 - 5.42/ 52.76)	gi 146102742	K.FPAFVVDFER.R (1225.32) R.SQVLLTFIDGDQYRPVSR.Q (2092.56)	electron carrier activity; protein disulfide isomerase activity; oxidoreductase activity	5	96	↑ BH46
A.31	beta tubulin (5.56/49.00 - 4.71/ 50.39)	gi 146078076	K.LAVNLVPFPR.L (1124.53) R.FPGQLNSDLR.K (1145.42) R.KLAVNLVPFPR.L (1252.63) R.INVYFDESTGGR.Y (1356.50) K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K (2032.80)	nucleotide/nucleoside/nucleobase binding assembly of protein complexes microtubule cytoskeleton	11	314	↑ BH46
A.33	putative pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit (5.44/48.00 - 5.64/ 38.44)	gi 146089026	K.VIAPYNCEDAR.G (1306.80) K.LAAEGVQAEVINLR.S (1482.02)	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity; Oxidoreductase.	7	144	↑ BH46
A.36	putative translation elongation factor 1-beta (4.60/41.00 - 4.61/ 23.22)	gi 146104117	R.LNAQPFVSGFSPSEDAR.I (1907.97) R.IFNEMFGSNVNVVIQWVAR.M (2123.99)	eukaryotic translation elongation factor 1 complex; translation elongation factor activity.	17	92	↑ BH46
A.38	beta tubulin (4.83/41.00 - 4.71/ 50.39)	gi 146078076	K.LAVNLVPFPR.L (1124.78) R.FPGQLNSDLR.K (1145.71) R.KLAVNLVPFPR.L (1252.88)	nucleotide/nucleoside/nucleobase binding assembly of protein complexes microtubule cytoskeleton	14	455	↑ BH46

			R.INVYFDESTGGR.Y (1352.76) R.INVYFDESTGGR.Y (1356.76) R.AVLMDLEPGTMDSVR.A (1632.88) K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K (2032.87)				
A.39	beta tubulin (4.93/41.00 - 4.71/ 50.39)	gi 146078076	R.FPQLNSDLR.K (1145.80) R.FPQLNSDLR.K (1146.79) R.INVYFDESTGGR.Y (1356.88) K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K (2032.99)	nucleotide/nucleoside/nucleobase binding assembly of protein complexes microtubule cytoskeleton	9	256	↑ BH46
A.39	beta tubulin (4.93/41.00 - 4.74/ 50.34)	gi 146086185	R.INVYFDESTGGR.Y (1356.88) K.GHYTEGAELIDSVLDVCR.K (2032.99) R.FPQLNSDLR.K (1145.80) R.FPQLNSDLR.K (1146.79)	nucleotide/nucleoside/nucleobase binding assembly of protein complexes microtubule cytoskeleton	9	254	↑ BH46
A.40	alpha tubulin (5.23/43.00 - 5.08/ 54.94)	gi 339897551	R.LIGQVVSSLTASLR.F (1442.80) R.SLDIERPSYTNVNR.L (1662.84) R.CIFLDLEPTVVDEV.R.T (1803.87)	GTPase activity; GTP binding; structural molecule activity; major constituent of microtubules.	8	185	↑ BH46
A.46	alpha tubulin (5.18/39.00 - 5.08/54.94)	gi 339897551	R.QLFNPEQLVSGK.E (1358.79) R.SLDIERPSYTNVNR.L (1663.01) R.CIFLDLEPTVVDEV.R.T (1804.13)	GTPase activity; GTP binding; structural molecule activity; major constituent of microtubules.	8	209	↑ BH46
A.47	alpha tubulin (5.18/38.00 - 5.08/54.94)	gi 339897551	R.SLDIERPSYTNVNR.L (1662.78) R.CIFLDLEPTVVDEV.R.T (1803.90)	GTPase activity; GTP binding; structural molecule activity; major constituent of microtubules.	5	128	↑ BH46
A.53	putative IgE-dependent histamine-releasing factor (4.29/33.00 - 4.39/19.60)	gi 146088052	R.KVFQTNAAAFVK.K (1322.67)		7	51	↑ BH46
A.56	Peroxidoxin (5.20/34.00 - 6.43/25.58)	gi 146086967	R.HSTINDLPVGR.N (1207.61) R.DYGVLIIESGIALR.G (1533.80)	antioxidant activity; peroxiredoxin activity	11	119	↑ BH46

A.57	Peroxidoxin (5.42/34.00 - 6.43/25.58)	gi 146086967	R.HSTINDLPVGR.N (1207.72) R.DYGVLEESGIALR.G (1533.94) R.EAAPQFSGQAVVNGAIK.D (1686.97) K.LNTQVVAVSCDSVYSHLAWVNTPR.K (2715.63)	antioxidant activity; peroxiredoxin activity	29	253	↑ BH46
A.62	beta tubulin (4.83/30.00 - 4.71/50.39)	gi 146078076	R.VGEQFTGMFR.R (1170.51) R.RVGEQFTGMFR.R (1326.59) K.NSSYFIEWIPNNIK.S (1723.69) K.MSVTFIGNNTCIQEMFR.R + Oxidation (M) (2063.78)	nucleotide/nucleoside/nucleobase binding assembly of protein complexes microtubule cytoskeleton	9	205	↑ BH46
A.63	putative ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor (5.83/28.00 - 6.74/21.64)	gi 146081837	K.ECVQSGQFR.L (1109.54) K.VKPNEESWTWVLK.E (1614.86) R.YYDEAGEVLVNMNVK.N + Oxidation (M) (1752.96) K.EHPSTLAQQQLFDIK.I (1840.98)	ribonucleoprotein complex; nucleic acid binding.	28	178	↑ BH46
A.65	alpha tubulin (4.91/20.00 - 5.08/54.94)	gi 339897551	R.QLFNPEQLVSGK.E + Gln->pyro-Glu (N-term Q) (1341.75) R.QLFNPEQLVSGK.E (1358.78) R.CIFLDLEPTVVDEV.R.T (1804.07)	GTPase activity; GTP binding; structural molecule activity; major constituent of microtubules.	5	156	↑ BH46
A.66	Tryparedoxin (5.38/20.00 - 5.24/16.80)	gi 146093061	K.MPWLSIPFEK.R + Oxidation (M) (1262.94) R.HALTQDPEGEQFPWR.D (1811.21)		17	95	↑ BH46
A.68	cyclophilin 2 (6.74/22.00 - 6.51/20.46)	gi 146070754	K.VYFDVMIDSEPLGR.I (1640.14)	protein folding; peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity; protein peptidyl-prolyl isomerization;	7	51	↑ BH46
A.70	Tryparedoxin (5.26/17.00 - 5.24/16.80)	gi 146093061	K.VESIPTLIGLNADTGDVTTR.A (2172.58)		14	80	↑ BH46

A.71	Tryparedoxin (5.13/14.00 - 5.24/16.80)	gi 146093061	K.MPWLSIPFEK.R + Oxidation (M) (1266.74) R.HALTQDPEGEQFPWR.D (1810.11)		17	86	↑ BH46
A.72	conserved hypothetical protein (5.56/13.00 - 5.53/13.38)	gi 146084262	R.KDDPPHWFGE LR.T (1495.82)		10	67	↑ BH46