

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Análise proteômica comparativa de linhagens de *Leishmania (V.) braziliensis* e de
Leishmania (L.) infantum sensíveis e resistentes aos antimoniais.**

por

Fabiana da Silva Vieira Matrangolo

**Belo Horizonte
Agosto/2013**

TESE DBCM-CPqRR F.S.V. MATRANGOLO 2006

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

Análise proteômica comparativa de linhagens de *Leishmania V. braziliensis* e de *Leishmania L. infantum* sensíveis e resistentes aos antimoniais.

por

Fabiana da Silva Vieira Matrangolo

**Tese apresentada com vistas à
obtenção do Título de Doutor em
Ciências na área de concentração
Biologia Celular e Molecular.
Orientação: Dra. Silvane Maria
Fonseca Murta**

**Belo Horizonte
Agosto/2013**

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M425a Matrangolo, Fabiana da Silva Vieira.
2013

Análise proteômica comparativa de linhagens de *Leishmania V. braziliensis* e de *Leishmania L. infantum* sensíveis e resistentes aos antimoniais / Fabiana da Silva Vieira Matrangolo. – Belo Horizonte, 2013.

XVI, 82 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 88 - 98

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Leishmaniose/quimioterapia 2. *Leishmania braziliensis* /parasitologia 3. *Leishmania infantum*/parasitologia I. Título. II. Murta, Silvane Maria Fonseca (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 4

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós - graduação em Ciências da Saúde

Análise proteômica comparativa de linhagens de *Leishmania V. braziliensis* e de *Leishmania L. infantum* sensíveis e resistentes aos antimoniais.

por

Fabiana da Silva Vieira Matrangolo

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta (Presidente)

Prof. Dr. Elio Babá

Profa. Dra. Renata Guerra Sá

Profa. Dra. Patrícia Cuervo

Profa. Dra. Laila Alves Nahum

Suplente: Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

Tese defendida e aprovada em: 02/08/2013.

Dedicatórias

**Aos meus pais, Ana e Adair
Ao meu esposo, Paulo Fernando
Aos meus filhos, Manuel Henrique, Mariana e Luis Miguel
Aos meus irmãos, Luciane e Júnior**

Porque Família é tudo

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por me permitir alcançar mais este objetivo, guiando meus passos e pensamentos, e por sempre me acompanhar.

Aos meus pais, Ana da Silva Vieira e Adair Vieira, pelo apoio, pela colaboração, pela força, pela dedicação e, principalmente, pelo exemplo de vida.

Ao meu marido, Paulo Fernando, pelo amor, carinho, dedicação, paciência e apoio durante toda esta etapa da minha vida.

Aos meus filhos, pelo amor, carinho e compreensão, e por, mesmo tão pequenos, aceitarem dividir a mãe com a ciência.

Aos meus irmãos e cunhados, pelo apoio e encorajamento para seguir em frente.

À Dra. Silvane Maria Fonseca Murta, por ter me orientado durante este período e pela sua atenção, presença e dedicação, sem as quais este trabalho não seria possível.

À Dra. Rosiane Aparecida Silva Pereira, pela assistência, pelo encorajamento, pelo apoio e, principalmente, pela amizade e pelo voto de confiança.

Aos nossos colaboradores: Dr. Carlos Priminho Pirovani e André da Silva Santiago, da Universidade Estadual de Santa Cruz, pela importante colaboração nos ensaios de espectrometria de massas.

Ao Dr. Elio Babá e à Dra. Renata Guerra Sá, pelas sugestões ao meu exame de qualificação de tese, pois foram fundamentais para o trabalho aqui apresentado.

Aos participantes da banca examinadora, por terem aceitado o meu convite e pelas contribuições valiosas que, certamente irão engrandecer a minha tese e a mim mesmo.

A Maíra, Laila e Melina pela valiosa ajuda nos ensaios de focalização isométrica, seleção de *spots* e digestão triptica.

Aos grandes amigos que fiz ao longo destes anos no CPqRR e a todos os amigos e colegas do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular.

Ao Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, representado pelo chefe, Dr. Guilherme Correa Oliveira, e ao Centro de Pesquisas René Rachou, representado pelo diretor,

Dra. Zélia Maria Profeta da Luz, pelo auxílio financeiro e pela estrutura para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas da Universidade Estadual de Montes Claros, pelo apoio na conclusão de mais uma etapa.

Ao coordenador do curso de pós-graduação Dr. Edelberto Santos Dias, e às agências financiadoras CNPq, FAPEMIG e FIOCRUZ.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a conquista de mais esta vitória em minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Agente etiológico, ciclo biológico e epidemiologia das Leishmanioses.....	17
1.2 Controle das Leishmanioses.....	20
1.3 Quimioterapia das leishmanioses.....	21
1.4 Resistência de <i>Leishmania</i> spp. a drogas	23
1.4.1 Mecanismos de resistência de <i>Leishmania</i> spp. aos antimoniais	24
1.5 Estrutura e organização genômica de <i>Leishmania</i>	27
1.6 Proteômica.....	29
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Amostras de <i>Leishmania</i> spp.....	34
3.2 Preparo do extrato proteico	34
3.3 Eletroforese bidimensional (2-DE)	35
3.4 Análise de imagem.....	36
3.5 Identificação de proteínas.....	37
3.6 Espectrometria de massa	37
3.7 Análise da expressão das proteínas por <i>Western blotting</i>	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Análise proteômica.....	40
4.1.1 Perfil eletroforético em gel bidimensional (2-DE) em gradiente de pH imobilizado (IPGs) 40	
4.1.2 Análise das imagens e seleção dos <i>spots</i>	40
4.2 Agrupamento das proteínas identificadas por espectrometria de massas em classes com base nos processos biológicos anotados em banco de dados	46
4.3 Análise comparativa entre as linhagens de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> sensíveis e resistentes ao antimonial	54

4.4	Análise do nível de expressão das proteínas ciclofilina-A, pteridina redutase e triparedoxina peroxidase em linhagens de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> sensíveis e resistentes ao antimonial	55
5	DISCUSSÃO	60
5.1	Análise comparativa de linhagens de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> resistentes e sensíveis ao antimonial.....	60
5.2	Proteínas de choque térmico, chaperonas moleculares e proteínas que respondem ao estresse.....	63
5.3	Proteínas do citoesqueleto.....	66
5.4	Proteínas da defesa antioxidante e de desintoxicação.....	67
5.5	Processamento de RNA/DNA e biossíntese de proteínas.....	68
5.6	Enzimas metabólicas.....	69
5.7	Proteínas hipotéticas, localização genômica, análise de sítio e predição funcional.....	71
5.8	Relação entre as proteínas com abundância diferencial nas linhagens de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> resistentes ao antimonial SbIII e as proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência descritos.....	72
6	Conclusões.....	75
7	ANEXOS	77
7.1	Tabela de peptídeos das proteínas identificadas.....	77
7.2	Artigo publicado.....	86
8	REFERENCIAS.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	18
Figura 2- Distribuição geográfica das leishmanioses no mundo.....	20
Figura 3- Mecanismos de ação e de resistência propostos para antimônio em <i>Leishmania</i> spp.	26
Figura 4- Perfil 2-DE, pH 3-10 NL, de extratos proteicos de linhagens de <i>L. braziliensis</i> (A) e de <i>L. infantum</i> (B) resistentes SbR e sensíveis WTS ao tartarato potássico de antimônio (SbIII).	42
Figura 5- Perfil 2-DE, pH 4-7, de extratos proteicos de linhagens de <i>L. braziliensis</i> (A) e de <i>L. infantum</i> (B) sensíveis WTS e resistentes SbR ao tartarato potássico de antimônio (SbIII).....	43
Figura 6- Triplicatas 2-DE de extratos proteicos de linhagens de <i>L. braziliensis</i> sensíveis WTS e resistentes SbR ao tartarato potássico de antimônio (SbIII).....	44
Figura 7- Triplicatas 2-DE de extratos proteicos de linhagens de <i>L. infantum</i> sensíveis WTS e resistentes SbR ao tartarato potássico de antimônio (SbIII).....	45
Figura 8- Imagem do gel <i>Master</i> construído a partir da análise pareada das imagens dos grupos de réplicas das linhagens LbWTS <i>versus</i> LbSbR (A) e LcWTS <i>versus</i> LcSbR (B). ...	48
Figura 9- Representação gráfica da dispersão dos <i>spots</i> únicos/mais abundantes nas linhagens LbWTS e LbSbR (A), LcWTS e LcSbR (B).....	49
Figura 10- Diagrama de Venn mostrando a análise proteômica comparativa das proteínas identificadas por 2-DE seguida por LC/MS/MS	54
Figura 11- Análise da expressão de CYPA em linhagens <i>Leishmania</i> spp.....	56
Figura 12- Análise proteômica e <i>Western blotting</i> 2-DE de PTR1 nas linhagens LbWTS e LbSbR.....	57
Figura 13- Análise proteômica e Western blot 2-DE da triparedoxina peroxidase em linhagens <i>Leishmania</i> spp. sensíveis e resistentes ao antimonial.....	58

Figura 14- Análise do nível de expressão de ciclofilina-A (CYPA), pteridina redutase (PTR1) e triparedoxina peroxidase (TRYP) em linhagens de *L. braziliensis* (Lb) e de *L. infantum* (Lc) resistentes e sensíveis ao antimonial. 59

Figura 15- Proteínas com abundância diferencial nas linhagens resistentes LbSbR e LcSbR.
74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Análise qualitativa e quantitativa dos perfis 2-DE de proteínas de linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* resistentes e sensíveis ao antimonial.....**46**
- Tabela 2-** Número de proteínas identificadas em cada linhagem de *Leishmania* spp. agrupadas com base nos processos biológicos.**47**
- Tabela 3-** Proteínas diferencialmente expressas nas linhagens resistentes (LbSbR) ou sensíveis (LbWTS) de *L. braziliensis* comparado com seus respectivos pares.**50**
- Tabela 4-** Proteínas diferencialmente expressas nas linhagens resistentes (LcSbR) ou sensíveis (LcWTS) de *L. infantum*) comparado com seus respectivos pares.**52**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABC-“ATP-binding cassette”

ATP-Adenosina trifosfato

BLAST-“Basic Local Alignment Sequence Tool”

CDC-Centro Norte Americano de Controle de Doenças

CsA-Ciclosporina

CYPA-ciclofilina-A

DNA-Ácido desoxirribonucléico

EDTA-Ácido etilenodiaminotetracético

IEF-Focalização isoeétrica

GO-“Gene Ontology”

GRP-78-“Glucose-regulated protein 78”

HIV-Vírus da Imunodeficiência Humana

IC50-Concentração Inibitória de 50%

kDNA-DNA do cinetoplasto

LbSbR-*L. V. braziliensis* resistente ao SbIII, população de *Leishmania*

LC-Leishmaniose Cutânea

LMC-Leishmaniose Muco-Cutânea

LTA-Leishmaniose Tegumentar Americana

LV-Leishmaniose Visceral

MDR-“Multidrug Resistance”

mRNA-RNA mensageiro

MRP-“Multidrug Resistance Protein”

MTX-Metotrexato

NR-“Non-redundant”

OMS-Organização Mundial de Saúde

ORF-“Open Read Frame”

p-Coefficiente de decaimento

PGP-Fosfoglicoproteína

pH-Potencial Hidrogeniônico

pI-Ponto Isoelétrico

PPIase-peptidil-prolil isomerase cis/trans

PTR1-Pteridina redutase 1

RNA-Ácido Ribonucléico

SbIII-Antimonial Trivalente

SbR-SbIII Resistente, população de *Leishmania*

SbV-Antimonial Pentavalente

SDS-Duodecil sulfato de sódio

SUMO-“Small Ubiquitin-related Modifier”

TDR-Redutase dependente de tiol

® ou TM-Marca registrada

TRYP-triparedoxina peroxidase

TSH-Tripanotona

UTR-Região não traduzida

WTS-População do tipo selvagem (população de *Leishmania*)

RESUMO

A emergência de espécies de *Leishmania* resistentes ao antimonial é um grave problema em vários países. A quimioterapia é a medida mais importante para o controle das leishmanioses, visto que não existe ainda uma vacina eficiente para uso em humanos. Além disso, o controle vetorial é difícil em razão das características ambientais muito diversas e da existência de um grande número de reservatórios domésticos e silvestres dificulta também o controle. Os antimoniais pentavalentes, SbV, são os medicamentos de primeira escolha no tratamento de todas as formas de leishmaniose em vários países. Apesar de serem amplamente utilizados na quimioterapia das leishmanioses por mais de setenta anos, apresentam alta toxicidade no tratamento clínico. Também, alguns pacientes são resistentes ao tratamento clínico com esses compostos. Neste trabalho, realizou-se uma análise proteômica comparativa entre linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* sensíveis e resistentes ao SbIII mediante a utilização da metodologia 2-DE, seguida por espectrometria de massas (LC/MS/MS). Nesta tese utiliza-se a nomenclatura *L. infantum* (syn. *L. chagasi*). A análise comparativa dos perfis proteômicos entre as linhagens de *Leishmania* analisadas revelou que 192 *spots* foram únicos e/ou mais abundantes. Dos 132 *spots* proteicos submetidos à análise por MS, 80 foram identificados correspondendo a 57 proteínas distintas. A análise comparativa dos dados mostrou que a maioria das proteínas com abundância diferencial em ambas as espécies está envolvida na defesa antioxidante, na resposta geral ao estresse, no metabolismo de glicose e de aminoácidos e na organização do citoesqueleto. Cinco proteínas foram mais abundantes em ambas as linhagens de *Leishmania* resistentes ao SbIII: triparedoxina peroxidase, alfa-tubulina, HSP83, HSP70 e HSP60. Os ensaios de *Western blotting* 1-DE e 2-DE confirmaram os dados da análise proteômica. Estes ensaios revelaram que a ciclofilina-A é menos expressa em ambas as linhagens resistentes, LbSbR e LcSbR. De outro lado, a pteridina redutase é mais expressa na linhagem resistente LbSbR e apresenta nível de expressão similar entre as linhagens sensíveis e resistentes de *L. infantum*. A triparedoxina peroxidase é mais abundante em ambas as linhagens resistentes, LbSbR e LcSbR. Estes resultados sugerem que o aumento da expressão de enzimas da defesa antioxidante pode desempenhar papel significativo na resistência dos parasitos aos antimoniais. Em conjunto, os dados mostram que o mecanismo de resistência de *Leishmania* spp. ao antimônio é complexo e multifatorial. É importante ressaltar que entre as 57 proteínas identificadas como diferencialmente abundantes entre as linhagens de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao antimonial 17 foram identificadas anteriormente por outros autores e que as outras 40 foram observadas apenas em nossa análise proteômica de linhagens de *Leishmania* spp. resistentes ao SbIII. Acreditamos que algumas dessas proteínas estejam associadas com a resposta geral ao estresse e que outras podem estar associadas ao mecanismo de resistência ao antimônio em *Leishmania* spp. Neste contexto, a futura análise funcional será muito importante para determinar a possível associação destas proteínas com o fenótipo de resistência de *Leishmania* aos antimoniais.

ABSTRACT

The emergence of drug-resistant *Leishmania* species is a significant problem in several countries. Chemotherapy is the most important alternative for controlling leishmaniases, since there is no effective vaccine for using in humans. Furthermore, the vector control is difficult due to different environmental characteristics and the existence of a large number of domestic and wild reservoirs. Pentavalent antimonials, Sb V, are the first-choice drugs in the treatment of all forms of leishmaniases in several Countries. Although they are widely used in the chemotherapy of leishmaniases for more than 60 years, they have high toxicity and some patients are resistant to clinical treatment with these compounds. In this study, we carried out a comparative proteomic analysis of antimony-susceptible and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* (LbSbR) and *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) (LcSbR) lines using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by mass spectrometry (LC/MS/MS) for protein identification. Comparative analysis of proteomic profiles between the *Leishmania* lines analyzed showed that 192 *spots* were unique and/or most abundant. Out of 132 protein *spots* submitted to MS, we identified 80 that corresponded to 57 distinct proteins. Comparative analysis showed that most of the protein *spots* with differential abundance in both species are involved in antioxidant defense, general stress response, glucose and amino acid metabolism, and cytoskeleton organization. Five proteins were more abundant in both SbIII-resistant *Leishmania* lines: tryparedoxin peroxidase, alpha-tubulin, HSP83, HSP70, and HSP60. Analysis of protein abundance by *Western blotting* assays 1-DE e 2-DE confirmed our proteomic data. These assays revealed that cyclophilin-A is less expressed in both LbSbR and LcSbR lines. On the other hand, the expression of pteridine reductase is higher in the LbSbR line, and it has similar expression level between SbIII-susceptible and -resistant *L. infantum* lines. The tryparedoxin peroxidase is overexpressed in both LbSbR and LcSbR lines. These results suggest that an increased in expression of anti-oxidant defense enzymes may play a significant role in the antimonial resistance in these parasites. Together, these results showed that the mechanism of antimony-resistance in *Leishmania* spp. is complex and multifactorial. Interestingly, among the 17out of 57 proteins identified as differentially abundant between SbIII-susceptible and -resistant lines, were also previously identified by others authors and the other 40 proteins were observed only in our proteomic analysis of SbIII-resistant *Leishmania* spp. lines. We believe that some of them are associated with the general stress response and others may be associated with the mechanism of resistance of *Leishmania* spp. to antimony. In this context, functional analysis will be very important to determine a possible association of these proteins with the antimony-resistance phenotype in *Leishmania*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Agente etiológico, ciclo biológico e epidemiologia das Leishmanioses

Os protozoários parasitos do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastidea; família Trypanosomatidae) são agentes etiológicos das leishmanioses. Os parasitos desta família são caracterizados pela presença de uma única mitocôndria, na qual está situado o cinetoplasto, uma organela especializada que contém o DNA mitocondrial, ou do cinetoplasto do parasito (kDNA) (Pestov et al., 1984). O gênero *Leishmania* é constituído por espécies heteroxênicas, que alternam seu ciclo de vida entre hospedeiros vertebrados e invertebrados.

O ciclo biológico da *Leishmania* inicia-se com o repasto sanguíneo do hospedeiro invertebrado. Os flebotomíneos, ao picarem um hospedeiro infectado, ingerem macrófagos parasitados com as formas amastigotas de *Leishmania*. No trato digestivo do inseto, ocorrem o rompimento dos macrófagos e a liberação dos parasitos. Esses amastigotas se reproduzem por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas promastigotas procíclicas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. Alguns dias depois, as formas promastigotas transformam-se em paramastigotas, as quais colonizam o esôfago e a faringe do inseto vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio, quando se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas infectantes (Lainson, 1983; WHO, 2010).

A transmissão das leishmanioses para o hospedeiro vertebrado, geralmente, ocorre pela picada de fêmeas de insetos, contendo parasitos infectantes, que, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas, juntamente com a saliva. Na epiderme do hospedeiro, estas formas infectantes são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos. No interior dos macrófagos, no vacúolo parasitóforo, as promastigotas se diferenciam em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento da célula, ocorrendo a liberação das formas amastigotas, que serão fagocitadas por novos macrófagos, num processo contínuo (WHO, 2010). O ciclo de vida de *Leishmania* spp. partindo da infecção do hospedeiro vertebrado está representado resumidamente na Figura 1.

O gênero *Leishmania* compreende cerca de 30 espécies de protozoários morfologicamente semelhantes, entre as quais 21 são capazes de infectar humanos. As diferentes espécies são classificadas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, considerando-se a localização e o desenvolvimento do parasito no intestino do inseto vetor. Os parasitos do subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) colonizam o intestino anterior e médio. As espécies do subgênero *Leishmania* (*Viannia*), por sua vez, habitam todo o intestino. (Lainson & Shaw, 1978; WHO, 2010).

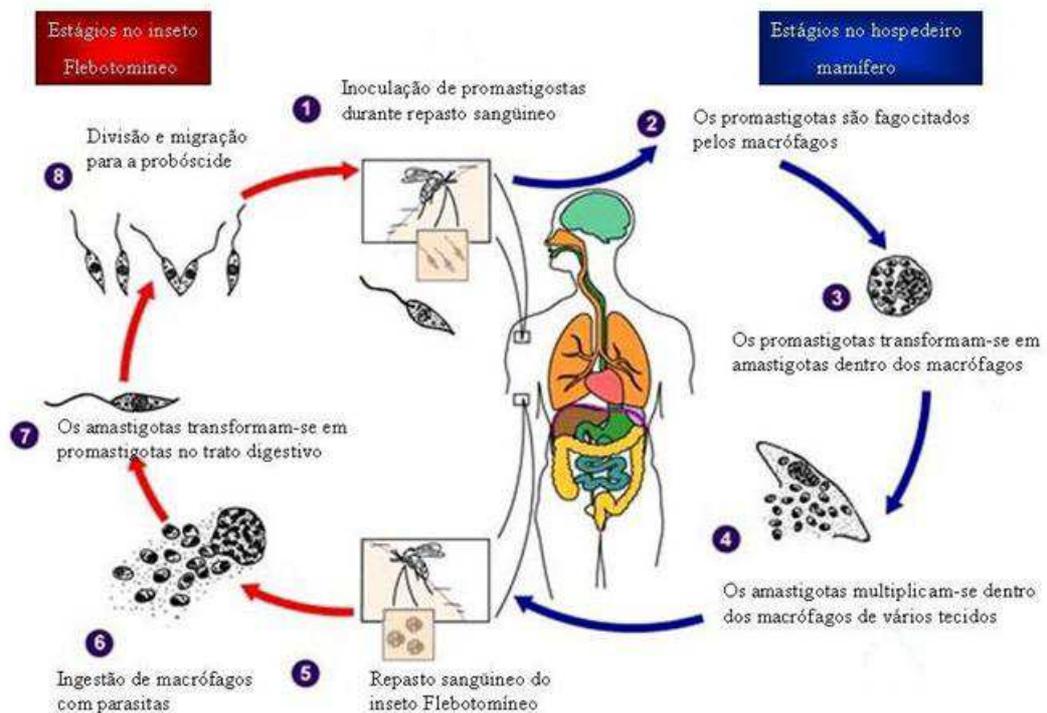


Figura 1- Ciclo de vida de *Leishmania*. O hospedeiro vertebrado é infectado com formas promastigotas durante repasto sanguíneo do inseto vetor. Nos macrófagos do hospedeiro, essas formas se diferenciam em amastigotas, que rompem as células e são novamente fagocitadas. Na ilustração, as setas vermelhas indicam todas as etapas ocorridas no inseto e as azuis, as etapas ocorridas no hospedeiro vertebrado. Modificado de WHO, 2010.

Com relação aos hospedeiros vetores, fêmeas de dípteros pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas) e *Phlebotomus* no Velho Mundo (África, Ásia e Europa) são os hospedeiros invertebrados destes parasitos (revisado por Gontijo & Carvalho, 2002). O parasito é mantido em um sistema ecológico constituído por uma única ou por restrito número de espécies de insetos flebotomíneos e por uma diversidade de mamíferos silvestres, sinantrópicos e domésticos, desde marsupiais a primatas, que atuam como reservatórios na transmissão da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

As leishmanioses variam em gravidade, apresentando diferentes formas: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) (Murray & Flanders, 2005). A infecção cutânea (LC) provoca lesões na pele das partes expostas do corpo, as quais levam muitos meses para cicatrizar e podem deixar cicatrizes permanentes. Dependendo do agente causador, podem disseminar-se para superfícies mucosas. A LMC é caracterizada pela disseminação de parasitos da pele à mucosa naso-orofaríngea. É causada pela infecção por espécies dos complexos *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. A LV é causada, principalmente, por membros do complexo *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo) (Murray & Flanders, 2005; Sousa & Pearson, 2009). A LV é a forma mais grave da doença. Os parasitos invadem os gânglios linfáticos e a medula óssea, bem como órgãos

internos, fígado e baço. É fatal se não for tratada. Na literatura, já é um consenso que *L. L. chagasi* (Novo Mundo) e *L. L. infantum* (Velho Mundo) são a mesma espécie, porém com denominações diferentes (Lainson & Rangel, 2005). Diante disso, nesta tese utiliza-se a nomenclatura *L. infantum* (syn. *L. chagasi*). Características genéticas do hospedeiro e do vetor, resposta imunológica e fatores ambientais influenciam o curso da doença. Entretanto, a apresentação clínica da doença é espécie-específica (Kindt et al., 2010; Lipoldová & Demant, 2006). A infecção com *Leishmania* não conduzem necessariamente a doença e, de acordo com a região e a espécie, os de portadores *Leishmania* podem ser assintomáticos e, estes são mais abundantes do que os pacientes com leishmaniose. (Ostyn et al. 2011).

Atualmente, estima-se que há no mundo 12 milhões de indivíduos infectados e que cerca de 350 milhões vivem em áreas de risco de infecção (Alvar et al., 2012). Parasitos do gênero *Leishmania* estão dispersos por todos os continentes, exceto a Antártida. Estima-se que a incidência mundial de Leishmaniose Visceral (LV) seja de 500 mil novos casos por ano, sendo que 90% destes ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. De outro lado, estima-se que a incidência mundial de Leishmaniose cutânea (LC) seja de 1,5 a 2,0 milhões de casos por ano, sendo que 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Paquistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. As leishmanioses são, na maioria das vezes, associadas à pobreza e ocorrem em quatro continentes, distribuídas em 88 países. Destes, 72 correspondem a países em desenvolvimento (Fig. 2).

O Brasil enfrenta atualmente a expansão e urbanização da LV com casos humanos e grande número de cães positivos em várias cidades de grande e de médio porte. O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural, hoje também se desenvolve em centros urbanos, como por exemplo, na região Nordeste, São Luís, Natal e Aracaju; na região Norte, Boa Vista e Santarém; na região Sudeste, Belo Horizonte e Montes Claros; e na região Centro-Oeste, Cuiabá e Campo Grande (Costa, 2004). De acordo com a Secretaria Municipal de Saúde, Belo Horizonte é hoje o município com alta densidade populacional que mais sofre com a ocorrência da leishmaniose visceral (LV). As taxas de letalidade são altas. A média dos últimos onze anos é de 13%, passando de 10,5% em 2008 para 19,3% em 2009 (<http://portalpbh.pbh.gov.br/pbh>). A dificuldade em fazer o controle vetorial, sacrificar os reservatórios domésticos e realizar o diagnóstico preciso dos pacientes tem levado à ocorrência cada vez mais frequente de óbitos (Costa, 2008; Gontijo & Melo, 2004; Silva et al., 2001; Werneck, 2008).

1.2 Controle das Leishmanioses

As leishmanioses apresentam grande prevalência mundial. Apesar disso, poucos avanços foram obtidos em seu controle. Mesmo com muitos esforços visando ao desenvolvimento de vacinas para imunoterapia ou imunoprofilaxia das leishmanioses, ainda não foi estabelecida uma vacina eficiente para uso em humanos (Gontijo & Melo, 2004; Modabber, 2010). No momento, a quimioterapia continua sendo a principal medida para o controle de todas as formas da leishmaniose. Entretanto, ela apresenta problemas, como: alta toxicidade dos fármacos (antimoniais e anfotericina) usados no tratamento clínico, alto custo e ocorrência de cepas de *Leishmania* resistentes ao tratamento com antimônio (Murray, 2010).

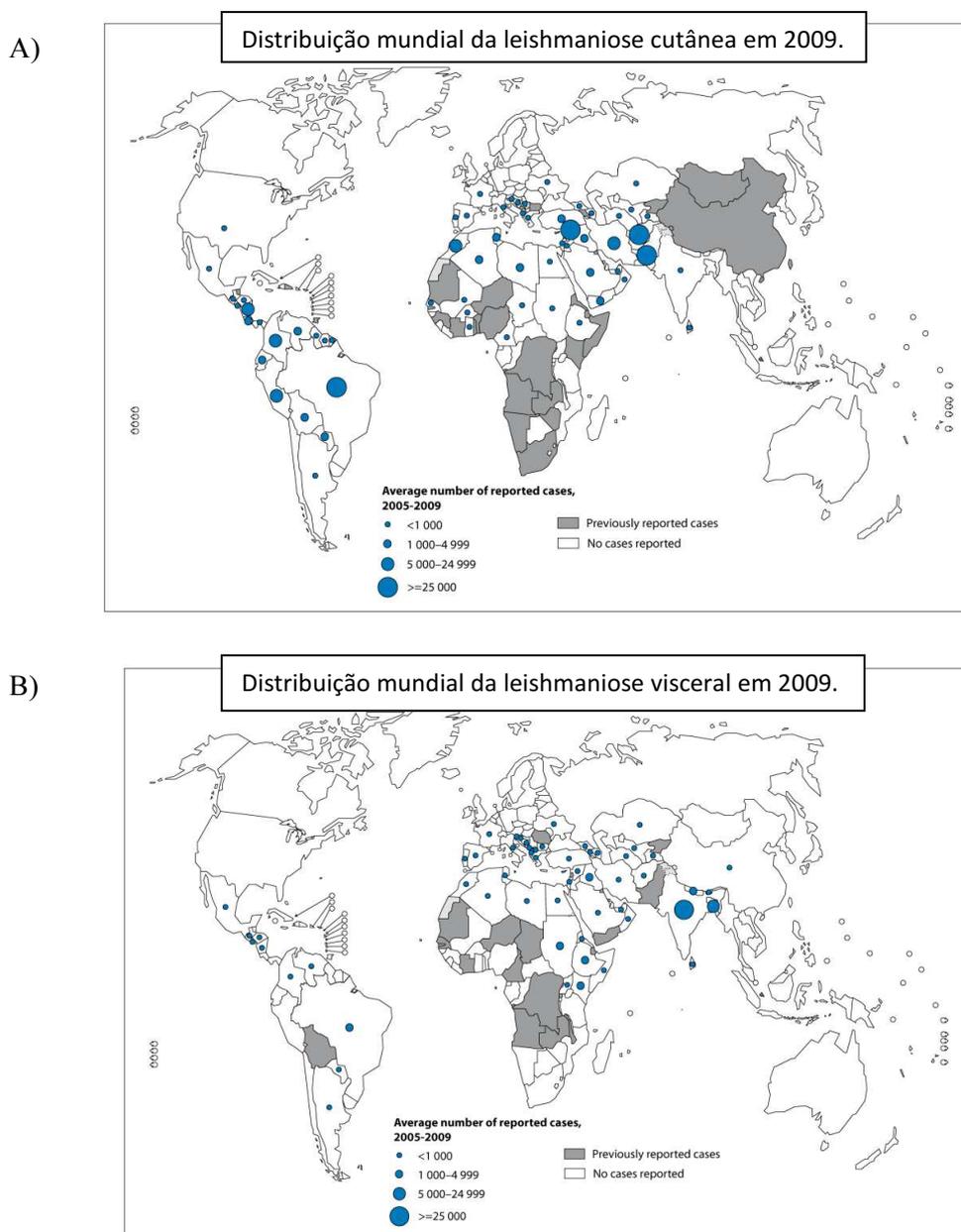


Figura 2- Distribuição geográfica das leishmanioses no mundo. O diâmetro dos círculos indica a média do número de casos notificados, de 2005 a 2009, variando de <1.000 a ≥ 25.000 . A) Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea. B) Distribuição geográfica da leishmaniose visceral. (Fonte: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/>)

Na década de 1950, teve início no Brasil um programa de controle voltado para intervir na cadeia de transmissão da LV. As estratégias de controle até então utilizadas estavam centradas e dirigidas verticalmente para o controle do reservatório canino (inquérito sorológico canino e eutanásia dos cães soropositivos) e para a aplicação de inseticidas, diagnóstico e tratamento adequado dos casos registrados. Em 2000, o Ministério da Saúde/FUNASA criou um programa baseado nos critérios epidemiológicos, ambientais e sociais. O novo enfoque incorpora áreas sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença nas ações de vigilância e controle, objetivando evitar ou minimizar a expansão da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A existência de reservatórios domésticos e silvestres e as características ambientais ainda dificultam o controle das leishmanioses. O uso de inseticida de ação residual direcionado para as formas adultas tem sido a base do controle do vetor para reduzir a população de flebotomíneos e os níveis de transmissão. Tal medida não atinge os efeitos esperados, pois se mostra descontínua. Então, ocorrem a reinfestação dos ambientes e o ressurgimento de casos humanos e caninos de LV. Outra ação de controle do vetor é centrada no reservatório canino. Dados da literatura revelam que coleiras impregnadas com deltametrina são eficientes na proteção dos animais (Gontijo & Melo, 2004).

1.3 Quimioterapia das leishmanioses

O tratamento das Leishmanioses teve início com a utilização do fármaco tartarato emético, cuja ação curativa foi descrita, em 1912, por Gaspar Vianna. Entretanto, devido à alta toxicidade, ele foi posteriormente substituído pelo antimônio pentavalente (SbV), que é eficaz contra todas as formas das leishmanioses e apresenta menor toxicidade. O medicamento de tratamento de primeira linha de todas as formas de leishmaniose usado na América do Sul, Norte da África, Turquia, Bangladesh e Nepal é o antimônio pentavalente SbV. Os países de língua latina comercializam o antimônio de N-metilglucamina (Glucantime®) e os de língua inglesa, o estibogluconato sódico (Pentostam®) (Roberts et al., 1998).

Os principais obstáculos para o tratamento das leishmanioses incluem: alta toxicidade dos fármacos, custo elevado (considerando o sistema de saúde pública de países em desenvolvimento), coinfeção *Leishmania*/HIV (com maior frequência de falhas terapêuticas) e surgimento da resistência ao antimônio pentavalente (principalmente na Índia) (Croft et al., 2006; Roberts et al., 1998; Sundar et al., 2000).

No Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato N-metilglucamina (Glucantime®), distribuído pelo Ministério da Saúde, em ampolas de 5ml, contendo 405mg de SbV. A dose recomendada e o tempo de duração do tratamento dependem dos sintomas clínicos, das condições de saúde do paciente e da ocorrência de coinfeções. Em geral, a dose recomendada é de 5 a 20mg/kg/dia, que deve ser feita por via parenteral, intramuscular ou endovenosa (CRLeish-IPEC/FIOCRUZ, 2004). Os principais efeitos colaterais do SbV vão desde incômodos, como disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, aumento da diurese, até reações adversas graves, como arritmias cardíacas e pancreatite (Berhe et al., 2001; Gasser, 1997).

Os antimoniais pentavalentes são pró-fármacos que sofrem redução biológica para a forma trivalente SbIII para ter atividade leishmanicida (Ouellette et al., 2004). Estudos sugerem que o SbV inibe a síntese de macromoléculas em amastigotas (Berman et al., 1985), possivelmente alterando o metabolismo energético, glicólise e oxidação de ácidos graxos (Berman et al., 1987). Dados também revelaram que o antimonial induz um processo de apoptose, envolvendo a fragmentação do DNA e a exteriorização de fosfatidilserina (Serenio et al., 2001). Outros estudos mostram que o antimonial trivalente SbIII causa distúrbios no potencial tiol redox do parasito, com efluxo de tióis intracelulares, tripanotiona e glutatona, inibindo a enzima tripanotiona redutase, o que levaria à sua morte (Wyllie et al., 2004 e 2010).

Apesar de ser empregado no tratamento das leishmanioses há mais de setenta anos, o mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está totalmente elucidado. Pacientes imunodeprimidos com leishmanioses respondem pouco aos antimoniais, apresentando 52% de falhas e recidivas após o tratamento (Desjeux, 1999). Esses dados sugerem um efeito cooperativo do sistema imune do hospedeiro e a eficácia do tratamento com os antimoniais.

No Brasil, a resposta ao Glucantime® varia de acordo com a forma clínica, sistema imune do hospedeiro e a área geográfica. Insucessos terapêuticos têm sido observados em 10% a 25% dos pacientes tratados (Marsden et al., 1985). Na Índia, o uso desta droga foi recentemente descontinuado, devido ao problema de resistência aos antimoniais, resultando em falha do tratamento em até 60% dos pacientes. Diante disso, o fármaco de escolha é a anfotericina B, um potente antifúngico (Lira et al., 1999; Sundar et al., 2000).

Nos últimos anos, novas alternativas terapêuticas foram desenvolvidas para o tratamento das leishmanioses. Podem-se citar alguns compostos, como a anfotericina B,

mencionada acima, e a miltefosina. A anfotericina B pertence ao grupo dos antibióticos politênicos produzidos por diferentes espécies de *Streptomyces*. É considerada a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, atuando nas formas promastigotas e amastigotas do parasito, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. No Brasil, o desoxicolato de anfotericina B é empregado no tratamento de segunda escolha, sendo recomendado para gestantes, casos graves de leishmaniose, falha terapêutica ou efeitos adversos intensos com o uso de antimoniais. No final da década de 1990, novas formulações da anfotericina B (anfotericina B lipossomal e anfotericina B dispersão coloidal) foram desenvolvidas, com reduzida toxicidade e maior eficácia no tratamento das leishmanioses (Ouellette et al., 2004; Sundar et al., 1998). Inicialmente desenvolvida como um agente antitumoral, a miltefosina (hexadecilfosfolina) é um alquil fosfolípido que pode ser administrado oralmente. Dados da literatura mostram uma variação na eficácia no tratamento com miltefosina, em relação à diferentes espécies de *Leishmania*. Estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que a miltefosina é ativa contra *L. donovani* (Croft et al., 1996; Le Fichoux et al., 1998). Entretanto, estudos realizados com *L. infantum* e outras espécies de *Leishmania* predominantes no Brasil sugerem que doses mais elevadas de miltefosina são necessárias para melhorar a eficácia de cura do tratamento de pacientes infectados (De Moraes-Teixeira et al., 2011). Além disso, dados da literatura demonstram que a resistência dos parasitos à miltefosina surge rapidamente (Berman, 2006).

Outro grave problema observado na quimioterapia das leishmanioses é o tratamento de cães. Embora o tratamento com antimoniais pentavalentes e alopurinol seja permitido em alguns países, essa medida não é eficaz, uma vez que os medicamentos são rapidamente eliminados da corrente sanguínea do animal. O uso rotineiro de drogas em cães induz à remissão temporária dos sinais clínicos, não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos e levam ao risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). No Brasil, estes fatores levaram o Ministério da Saúde a impedir o tratamento de cães com drogas de uso clínico em humanos (Portaria Interministerial 1.426, de 11 de Julho de 2008).

1.4 Resistência de *Leishmania* spp. a drogas

Dados indicam que a resistência aos antimoniais tem se tornado um problema na Índia e no Sudão. Na Índia, em torno de 60% dos pacientes com leishmaniose visceral não respondem ao tratamento com compostos antimoniais (Guerin et al., 2002; Sundar, 2001). Vários mecanismos de resistência a drogas têm sido identificados em espécies de *Leishmania* do

Velho Mundo (Croft et al., 2006). As espécies patogênicas de *Leishmania* do Novo Mundo apresentam considerável variabilidade na resposta à quimioterapia antimonial e cepas com diversos graus de resistência têm sido isoladas (Moreira et al., 1998; Romero et al., 2001). A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a responsável pela forma mucocutânea na América do Sul (Lainson, 1983) e, frequentemente, apresenta resistência a tratamentos de curta duração ou em baixas doses de antimoniais (Moreira et al., 1998; Moreira et al., 1995).

Nos últimos anos, doses progressivamente maiores dos antimoniais têm sido recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, devido ao aparecimento de resistência primária do parasito a essas drogas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Estudos *in vitro* apontam, ainda, para a possibilidade de seleção de populações de *Leishmania* resistentes a outras drogas, como a anfotericina B e a miltefosina (Mbongo et al., 1998; Rakotomanga et al., 2005).

O estudo da resistência a drogas é muito complexo, sendo que a resistência a uma única droga pode envolver mecanismos distintos. Os principais mecanismos de resistência a drogas descritos são: (1) diminuição da entrada da droga na célula; (2) eliminação da droga da célula pela fosfoglicoproteína de membrana (PGP) ou outras proteínas transportadoras dependentes de ATP; (3) diminuição da ativação da droga; (4) inativação da droga; (5) alteração da formação do complexo alvo-droga; e (6) eficiência no sistema de reparo de DNA (revisado por Borst & Ouellette, 1995; Ouellette & Borst, 1991; Ouellette et al., 2004).

1.4.1 Mecanismos de resistência de *Leishmania* spp. aos antimoniais

Embora o mecanismo de resistência de *Leishmania* aos antimoniais tenha sido amplamente estudado, muitas questões ainda não foram elucidadas e alguns resultados são aparentemente contraditórios (revisado por Croft et al., 2006). A divergência quanto ao mecanismo de resistência a drogas em *Leishmania* pode ser devido aos diferentes modelos de obtenção dos parasitos resistentes e de análise do fenótipo, além da diversidade natural de espécies de *Leishmania*. A diminuição da redução do SbV para SbIII foi demonstrada em formas amastigotas de *L. donovani* resistentes a antimoniais pentavalentes (Shaked-Mishan et al., 2001).

Duas enzimas de *Leishmania* envolvidas na redução de SbV a SbIII foram caracterizadas: Tiol-redutase dependente (TDR) (Denton et al., 2004) e *Leishmania major* SbV-AsV redutase (LmACR2) (Zhou et al., 2004). No entanto, é importante ressaltar que a redução da droga pode ocorrer tanto no citoplasma do parasito quanto na célula hospedeira

ou, mesmo, em um sistema extracelular (Brochu et al., 2003). Diante disso, a contribuição dessas enzimas no fenótipo de resistência a drogas ainda é incerta. Outro mecanismo de resistência a drogas descrito em *Leishmania* está associado com a proteína de membrana aquagliceroporina. Ela é responsável pela entrada de SbIII no parasito, sendo a baixa expressão desta proteína associada com a consequente diminuição dos níveis intracelulares de antimônio. Dessa forma, a aquagliceroporina possui um efeito modulador da resistência aos antimoniais (Gourbal et al., 2004).

Alguns autores também observaram aumento nos níveis de tripanotona (TSH) em parasitos resistentes ao SbIII (Mukhopadhyay et al., 1996). A exposição do parasito ao SbIII provoca efluxo de TSH da célula e inibição da tripanotona redutase, causando distúrbios no potencial tiol redox (Wyllie et al., 2004). O aumento nos níveis de TSH pode equilibrar o potencial tiol redox na presença da droga tornando o parasito resistente. É provável que a superexpressão de alguns componentes da via biossintética da TSH possa resultar no aumento dos níveis de TSH e, conseqüentemente, na resistência ao SbIII, como mostrado na Figura 3 (Croft et al., 2006).

Outra característica importante da TSH é sua capacidade de conjugar-se ao SbIII e, dessa forma, ser eliminada diretamente do parasito através da membrana plasmática ou sequestrada para o interior de um vacúolo pela PGPA (ABCC3). De fato, a superexpressão da PGPA foi observada em linhagens de *L. infantum* resistentes ao SbIII (El Fadili et al., 2005). Ela parece não ser a responsável pela eliminação do conjugado TSH-SbIII através da membrana plasmática. O transportador responsável pelo efluxo deste conjugado SbIII-TSH ainda não foi identificado (Croft et al., 2006).

A maioria dos estudos de resistência a drogas utilizou espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, de forma que pouco se sabe acerca dos mecanismos de resistência a drogas nas espécies endêmicas no Brasil. Moreira e colaboradores (1998), estudando amostras de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* naturalmente resistentes ao glucantime, constataram a ausência de superexpressão do gene PGPA, sugerindo que outros mecanismos poderiam estar envolvidos no fenótipo de resistência destas espécies de *Leishmania*. Posteriormente, o mesmo grupo observou a amplificação gênica extracromossomal de 30Kb que contém o gene PGPA (lgPGPA) em *L. guyanensis* resistente ao glucantime (Anacleto et al., 2003). Além da PGPA, Gazola e colaboradores (2001) mostraram que o perfil de aglutinação por lectinas foi alterado nessas amostras de *L. guyanensis* resistentes ao glucantime, indicando mudanças na estrutura bioquímica dos açúcares presentes na superfície celular. Os autores observaram que,

como ocorre em outras espécies de *Leishmania* não patogênicas e patogênicas do Velho Mundo, vários mecanismos colaboram na resistência ao SbV, em conjunto com a amplificação do gene PGPA (Anacleto et al., 2003).

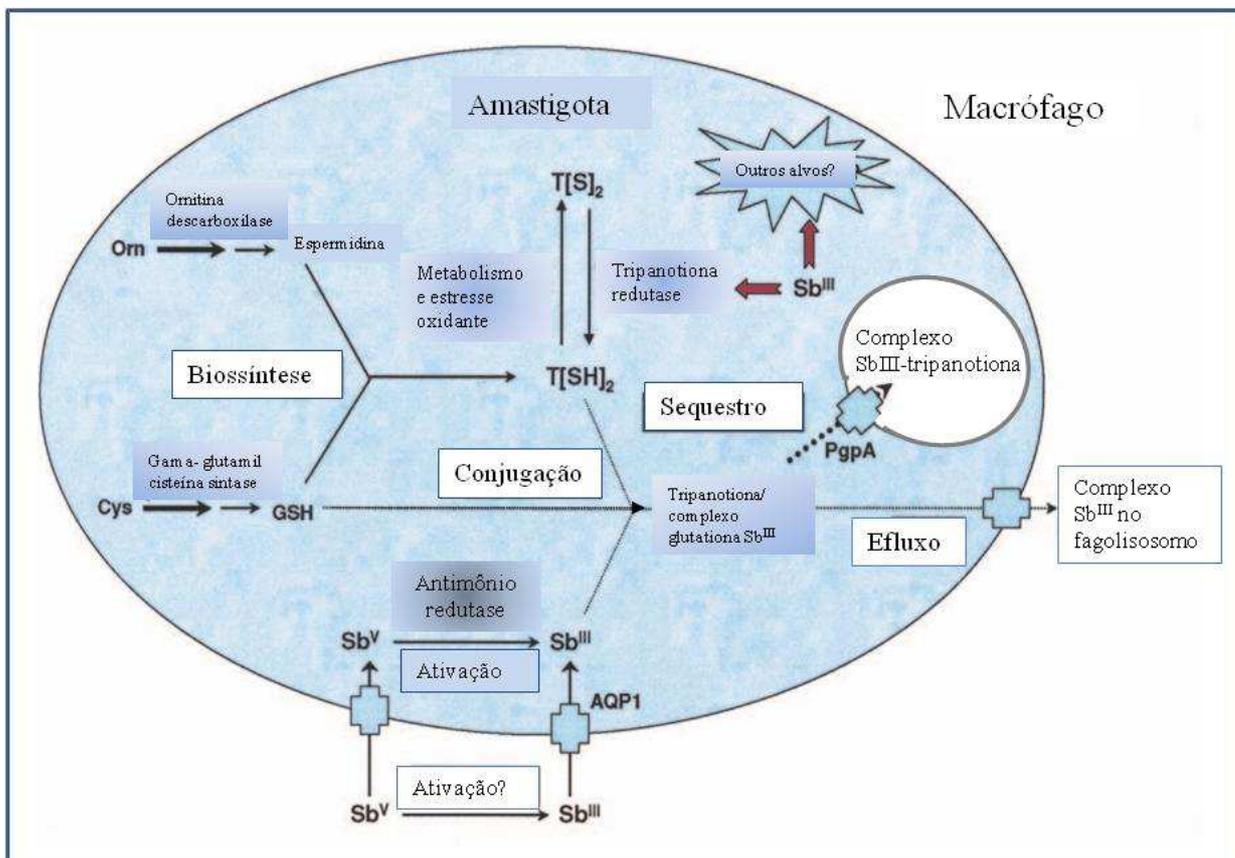


Figura 3- Mecanismos de ação e de resistência propostos para antimônio em *Leishmania* spp. Modificado de Croft et al., 2006.

Recentemente, com o objetivo de identificar possíveis marcadores de resistência ao antimônio em espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, procedeu-se à análise da expressão gênica por microarranjo de DNA. Neste estudo, foram analisadas quatro amostras de *L. amazonensis* com resistência induzida *in vitro* ao SbIII. Os autores observaram níveis mais elevados de tiol e maior nível de expressão mRNA do transportador ABC (MRP-A) nos parasitos resistentes ao SbIII quando comparado com a amostra selvagem. Além disso, maior níveis de transcrição dos genes das enzimas espermidina sintase, tripanotona sintase e tripanotona redutase também foram observados nas amostras resistentes ao SbIII (do Montenegro et al., 2011).

Diversos mecanismos de resistência de *Leishmania* aos antimoniais, antifolatos e anfotericina B, entre outras drogas, foram descritos, permitindo a identificação de diversas proteínas associadas com o fenótipo de resistência (revisado por Croft et al., 2006). No entanto, muitas questões ainda persistem, em parte, devido à variabilidade interespecífica do

parasito. Considerando que a expressão gênica em tripanosomatídeos é principalmente regulada ao nível pós-transcricional, a análise sistemática de proteínas é uma abordagem eficaz no estudo da expressão diferencial de proteínas nestes parasitos (Biyani et al., 2011).

1.5 Estrutura e organização genômica de *Leishmania*

Leishmania apresenta peculiaridades moleculares que a diferencia de outros eucariotos. A característica mais marcante da família Tripanosomatidae é a presença de uma só mitocôndria, na qual está situado o cinetoplasto, conforme mencionado anteriormente. Além disso, os tripanosomatídeos apresentam transcrição policistrônica, gerando RNAs imaturos, que contêm mais de um gene, como ocorre em procariotos (Gonzalez et al., 1985; Muhich & Boothroyd, 1988). A maturação do mRNA ocorre por um processo de *transplicing* de modo que na região 5' dos RNAs codificantes é adicionada uma sequência de 39 nucleotídeos, denominada minixon, ou *spliced leader* (SL). De outro lado, na região 3', é adicionada uma cauda de poliadenilação, sendo que ambos os processos parecem estar acoplados (Borst, 1986; LeBowitiz et al., 1993). A região intergênica 5' possui um sítio AG, que atua como receptor do SL. Dessa maneira, formam-se unidades de tradução monocistrônicas, compostas pelo minixon, gene e cauda de poliadenilação. Essa estrutura *cap*, ou minixon, protege o mRNA da ação de nucleases, prolongando sua vida média, além de assegurar a tradução.

Em *Leishmania*, não foi identificado nenhum promotor específico para DNA polimerase (Pol II), sendo que a transcrição de genes a partir de vetores não requer esse promotor (Freedman & Beverley, 1993; Kapler et al., 1990; Kelly et al., 1992; Kelly, 1995). Quase todos os genes de tripanosomatídeos não possuem íntrons, mas dependem da presença das regiões intergênicas para a expressão de genes, o que sugere que estas podem conter os sinais necessários para a transcrição e a maturação do mRNA (Papadopoulou et al., 2003). Assim, para a expressão transitória de genes em *Leishmania*, utilizam-se vetores de expressão circulares que contenham a sequência de um gene repórter flanqueado por regiões intergênicas do parasito.

Genomas de *Leishmania*, como os de outros tripanosomatídeos, são caracterizados por um elevado grau de sintenia. Eles não possuem grandes regiões subteloméricas, que codificam genes espécie-específicos (El-Sayed et al., 2005; Peacock et al., 2007). O genoma nuclear de *L. infantum*, *L. donovani* e *L. major* são compostos por 36 cromossomos (Wincker et al., 1997). De outro lado, o genoma de *L. braziliensis* tem apenas 35 cromossomos, como resultado de um evento de fusão envolvendo os cromossomos 20 e 34 (Britto et al., 1998;

Peacock et al., 2007). O genoma de *L. mexicana* consiste de 34 cromossomos, com dois eventos de fusão, um entre os cromossomas 8 e 29 e outro entre os cromossomas 20 e 36 (Britto et al., 1998).

Uma das características da estrutura do genoma de *Leishmania* é a presença de matrizes de genes duplicados em série (Ivens et al., 2005; Peacock et al., 2007). Esta estrutura permite a maior taxa de expressão de genes na ausência de controle transcricional que se encontra em outros eucariotos. A análise genômica comparativa das sequências de *L. major* Friedlin (IVENS et al., 2005), *L. infantum* JPCM5 e *L. braziliensis* M2904 (Peacock et al., 2007) revelou alta sintenia gênica, apesar da divergência estimada em 46 milhões anos entre estas espécies (Lukes et al., 2007) e um número reduzido de genes espécie-específicos (Peacock et al., 2007). Segundo os autores, o pequeno número de genes diferentes entre as três espécies pode ser compensado por um maior controle pós-transcricional (Peacock et al., 2007). A maioria dos genes espécie-específicos codificam proteínas com função desconhecida. Provavelmente, segundo os autores, estes genes podem contribuir para o tropismo do parasito e a patologia associada com as diferentes formas das leishmanioses (Peacock et al., 2007; Smith et al., 2007). Vários genes específicos de *L. donovani* foram expressos em *L. major* e aumentaram significativamente a sobrevivência do parasito em órgãos viscerais em ratos. Estes dados indicam que genes individuais podem contribuir para o tropismo do parasito no hospedeiro (Zhang & Matlashewski, 2010; Zhang et al., 2008).

Recentemente, o genoma nuclear de *L. (L.) mexicana* (Rogers et al., 2011) e de *L. (L.) tarentolae* (Raymond et al., 2012) foi sequenciado. A análise comparativa dos genomas de *L. mexicana*, juntamente com os de *L. major* Friedlin, *L. infantum* JPCM5 e *L. braziliensis* M2904, mostrou a presença de genes espécie-específicos de isolados da mesma espécie ou do complexo. Este estudo também identificou diferenças numéricas em cópia de genes e cromossomos entre as espécies de *Leishmania*, sendo uma importante fonte de variabilidade do genoma (Rogers et al., 2011). Raymond e colaboradores (2012), comparando o genoma de *L. (L.) tarentolae* com *L. (L.) infatum*, identificaram 95 sequências codificantes que são únicas em *L. (L.) tarentolae* e 250 genes que estavam ausentes nesta espécie. Segundo os autores, alguns destes genes presentes ou ausentes em *L. tarentolae* podem estar associados com a não patogenicidade desta espécie.

Uma vez que a regulação de genes em tripanosomatídeos é predominantemente pós-transcricional, uma abordagem proteômica tem sido amplamente utilizada para estudar a

expressão diferencial de proteínas em diferentes espécies de *Leishmania* (Cuervo et al., 2010; McNicoll et al., 2006).

1.6 Proteômica

A análise proteômica é definida como o conjunto de metodologias empregadas para caracterizar, qualitativa e quantitativamente, um proteoma. Pode ser usada tanto para identificar os componentes de complexos proteicos de pequenas e grandes organelas, ou de todo um organismo, como para determinar modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína (Beranova-Giorgianni, 2003; Steen; Mann, 2004; Tate, 2008). Atualmente, a proteômica utiliza tecnologias poderosas e imprescindíveis para a biologia celular e molecular, na medida em que permite a identificação de proteínas pelo conhecimento de sua estrutura primária, a determinação de modificações pós e cotraducionais, a localização e a quantificação da expressão de proteínas.

O termo *proteoma* foi descrito por Wilkins (1995), significando o conjunto de todas as proteínas expressas por um genoma. Dois enfoques principais têm sido empregados para analisar o conjunto de proteínas que atuam em um organismo em condições fisiológicas, assim como suas variações em diferentes situações fisiológicas e patológicas: de um lado, a eletroforese bidimensional em gel (2-DE), procedimento já bem conhecido e sedimentado; de outro, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série (LC/MS/MS), técnica eficiente para a análise de misturas complexas (Beranova-Giorgianni, 2003; Mann; Kelleher, 2008; Tuli; Resson, 2009) (<http://www.expasy.ch/swiss-2dpage/>).

Muitos grupos de pesquisa têm desenvolvido estudos do proteoma de diversos organismos e tipos celulares. Na área da protozoologia, podem-se citar alguns estudos de análise proteômica de diferentes estágios do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Atwood et al., 2005) e do *Plasmodium falciparum* (Florens et al., 2002; Lasonder et al., 2002). Uma das grandes inovações prometidas pelo conhecimento dos proteomas, além do entendimento das vias metabólicas celulares, é a possibilidade de identificar novos alvos quimioterápicos, assim como novas moléculas bioativas e marcadores biológicos, visando ao diagnóstico ou ao prognóstico de doenças. Recentemente, foi descrito por nosso grupo o proteoma de cepas do *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao Benzonidazol (BZ) (Andrade et al., 2008).

Várias abordagens foram utilizadas para analisar o perfil de expressão de proteínas de *Leishmania* spp. Os primeiros estudos foram realizados utilizando parasitos do subgênero *Leishmania*, numa abordagem convencional envolvendo eletroforese 2-DE. Lisados celulares foram utilizados para a identificar e caracterizar proteínas antigênicas de *L. tropica* (Hadman et al., 1981). Posteriormente, a proteômica foi utilizada para diferenciar espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose tegumentar americana (Saravia et al., 1984). A abordagem 2-DE também foi utilizada para identificar padrões de expressão de proteína estágio-específicas em *T. brucei* (Anderson et al., 1985).

Na última década, muitos estudos têm sido realizados com a análise proteômica de linhagens de *Leishmania* spp., os quais têm contribuído para o entendimento das alterações moleculares em diferentes fases do ciclo de vida desses parasitos e dos mecanismos de resistência a drogas e para a identificação de candidatos a vacinas e alvos de novas drogas. Esta metodologia tem sido extensivamente utilizada no estudo de diferentes padrões de expressão de genes durante o ciclo de vida das espécies de *Leishmania*, por exemplo, *L. donovani* (Bente et al., 2003; Morales et al., 2008; Rosenzweig et al., 2008; Thiel & Bruchhaus, 2001), *L. infantum* (Brotherton et al., 2010; Foucher et al., 2006; El Fakhry et al., 2002; McNicoll et al., 2006), *L. panamensis* (Walker et al., 2006) e *L. mexicana* (Nugent et al., 2004). O proteoma das formas amastigotas de *L. mexicana* foi comparado com o de promastigotas, combinando a metodologia clássica com a utilização de parasitos transgênicos fluorescentes (Paape et al., 2010).

Além desses estudos, a proteômica está sendo utilizada na análise do proteoma subcelular, em que um dos aspectos mais interessantes é a possibilidade de inferir função a proteínas com base na sua localização celular (Castro et al., 2004; Foucher et al., 2006; Hide et al., 2008; Veitch et al., 2004). Em estudos do secretoma, proteínas extracelulares secretadas ou liberadas pelos parasitos estão sendo analisadas. Estas proteínas são, normalmente, mediadores de interações parasito-hospedeiro. Recentemente, o secretoma de *L. donovani* (Silverman et al., 2008) e *L. braziliensis* (Cuervo et al., 2009) foram descritos.

Abordagens proteômicas têm sido realizadas para o estudo das mudanças nos padrões de expressão de proteínas em resposta à exposição dos parasitos a diferentes compostos e para a caracterização dos mecanismos de resistência a drogas. Métodos de proteômica também permitem a identificação de potenciais alvos terapêuticos e têm sido utilizados em processos de validação e desenvolvimento de medicamentos (Drummelsmith et al., 2003; Frearson et al., 2007; Kumari et al., 2008; Kumari et al., 2008). Vários estudos

foram descritos em relação à resistência *in vitro* ao antimonial. A maioria destes estudos foi realizada principalmente com espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. Porém, os mecanismos da resistência ao antimonial em espécies do Novo Mundo ainda não foram elucidados, assim como a resistência de isolados clínicos (Croft et al., 2006; Ouellette et al., 2004).

Os primeiros estudos de proteômica voltados para o objetivo de esclarecer os mecanismos de resistência a drogas em *Leishmania* spp. foram realizados por Drummelsmith et al. (2003, 2004). A comparação de mapas 2-DE de linhagens de *L. major* sensíveis e resistentes ao metotrexato revelou uma série de *spots* de proteínas diferencialmente expressas nas mesmas. Posteriormente, análises proteômicas foram realizadas usando linhagens de *L. donovani* sensíveis e resistentes ao arsenito (Sharma et al., 2009) e de linhagens de *L. infantum* resistentes a gentamicina (Daneshvar et al., 2012). Em relação ao antimônio, uma análise proteômica foi realizada utilizando amostras de isolados clínicos de *L. donovani* resistentes à SbV (Biyani et al., 2011; Kumar et al., 2010; Vergnes et al., 2007). Vergnes e colaboradores (2007) observaram que a proteína de choque térmico Hsp83 e a calpaína estão envolvidas com a morte celular programada induzida pelo antimônio. A análise proteômica comparativa de formas amastigotas axênicas de linhagens de *L. infantum* sensíveis e resistentes a SbIII revelou que a expressão da enzima arginino succinato sintetase foi aumentada e que o nível de expressão da proteína de membrana do cinetoplasto (KMP-11) foi reduzida nestes parasitos (El Fadili et al., 2009). A análise proteômica de linhagens de *L. panamensis* resistentes e sensíveis a SbIII revelou que os parasitos resistentes apresentaram alterações nos níveis de proteínas associadas as principais vias metabólicas e naquelas envolvidas na resposta geral ao estresse (Walker et al., 2012).

Um estudo de proteômica em isolados clínicos de *L. donovani* resistentes a drogas identificou proteínas relacionadas à resistência ao antimônio pentavalente em frações enriquecidas de membrana e citosólica (Kumar et al., 2010). As principais proteínas na fração enriquecida de membrana foram: transportador ABC, HSP-83, proteína transamidase GPI, proteína rica em cisteína-leucina e proteína L23a ribossomal 60S. Na fração citosólica, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), subunidade 5 alfa do proteassoma, carboxipeptidase, HSP-70, enolase, frutose-1,6-bifosfato aldolase, a cadeia beta-tubulina foram identificadas, sendo que muitas das proteínas mencionadas pertencem a famílias multigênicas. Muitas destas proteínas têm sido relatadas como potenciais alvos de drogas, exceto a L23a ribossomal 60S e a PCNA. Os autores sugerem que estas proteínas fornecem um vasto campo a ser explorado para novas estratégias de tratamento contra a LV, como a

clonagem e a superexpressão dessas para produzir proteínas recombinantes terapêuticas/profiláticas (Kumar et al., 2010). Usando espectrometria de massa quantitativa (iTRAQ), Biyani e colaboradores (2011) observaram que isolados de *L. donovani* resistentes ao SbV apresentaram aumento de regulação de proteínas de diferentes vias metabólicas, incluindo a glicólise, a gliconeogênese, o estresse oxidativo e a detoxificação.

Em síntese, alta toxicidade dos fármacos utilizados, alto custo, ocorrência de cepas resistentes ao tratamento e, ainda, o fato de não existir uma vacina eficaz disponível são pontos relevantes que direcionam para a busca de novos alvos para quimioterapia das leishmanioses.

Vários mecanismos de resistência ao antimônio em *Leishmania* spp. têm sido descritos na literatura. No entanto, muitas questões ainda estão sem resposta, em parte, devido à variabilidade interespecífica do parasito. Como a grande maioria dos estudos neste campo tem usado espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, pouco se conhece sobre os mecanismos de resistência a drogas nas espécies do Novo Mundo. Neste estudo, realizou-se uma análise proteômica comparativa de linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* resistentes e sensíveis ao SbIII, visando à identificação de proteínas que possam estar envolvidas nos mecanismos de resistência a drogas nas espécies estudadas. As populações resistentes foram mantidas na presença de diferentes concentrações de tartarato potássico de antimônio, de acordo seu coeficiente de resistência, conforme Liarte & Murta (2010). Para a análise proteômica, foram selecionadas as populações de *L. braziliensis* e de *L. infantum*, por serem espécies de maior relevância epidemiológica no Brasil, por serem de subgêneros diferentes e por causarem diferentes formas da doença: leishmaniose visceral e leishmaniose mucocutânea. Para confirmar os resultados das análises proteômicas, posteriormente, investigaram-se os níveis de expressão de algumas proteínas diferentemente expressas, como pteridina redutase, ciclofilina e triparedoxina peroxidase, por ensaios de *Western blotting* 1-DE e 2-DE.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a análise proteômica comparativa de linhagens de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) infantum* sensíveis e resistentes ao tartarato potássico de antimônio (SbIII).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de proteínas totais de linhagens de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) infantum* sensíveis e com resistência induzida *in vitro* ao tartarato potássico de antimônio (SbIII);
- Selecionar os *spots* proteicos diferencialmente expressos nas distintas linhagens;
- Identificar as proteínas selecionadas por espectrometria de massa;
- Analisar o nível de expressão das proteínas pteridina redutase, ciclofilina e triparedoxina peroxidase por meio de ensaios de *Western blotting* 1-DE e 2-DE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de *Leishmania* spp.

Formas promastigotas de linhagens de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904) e *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) foram utilizadas neste estudo. Os parasitos foram cultivados a 27°C em meio M199, suplementado com 40mM de HEPES pH 7.4, 1µg ml⁻¹ de biotina, 5µg ml⁻¹ de hemina, 2µg ml⁻¹ biopterina, 2mM de L-glutamina, 500 unidades de penicilina, 50µg ml⁻¹ de estreptomicina, e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado. Todos os experimentos foram realizados com parasitos na fase logarítmica de crescimento. As linhagens de *L. braziliensis* (LbSbR) e *L. infantum* (LcSbR) (LcSbR) vinte vezes e quatro vezes mais resistentes ao antimonial, respectivamente, foram previamente obtidas a partir de *L. braziliensis* (LbWTS) e *L. infantum* (LcWTS) selvagem, sob pressão contínua e crescente de tartarato potássico de antimônio (Sigma[®] Cat. 383376) (LIARTE; MURTA, 2010). Os pares de amostras sensíveis e resistentes ao antimonial foram cultivados sob condições idênticas, sendo que as amostras resistentes LbSbR e LcSbR foram cultivadas com as respectivas doses de IC₅₀ (concentração de SbIII capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitos), 2mg/ml e 1mg/ml. Para cada par de parasitos, três culturas independentes foram obtidas e utilizadas imediatamente ou congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C para a preparação do extrato proteico.

3.2 Preparo do extrato proteico

Extratos proteicos foram obtidos por lise direta de parasitos em tampão de lise [8M de ureia, 2M tiourea, 4% CHAPS, 50mM DTT, 20mM de Tris-base e metade da pastilha do coquetel de inibidores da protease (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets-Roche[®]*) para cada 10ml de tampão de lise] numa proporção de 100µl para $3,5 \times 10^8$ promastigotas. A lise dos parasitos foi realizada sob agitação por 2 horas, à temperatura ambiente (TA), para a solubilização das proteínas. Posteriormente, as amostras foram passadas em seringas de insulina (tamanho da agulha 30-Gauge), por dez vezes ou até diminuir a viscosidade da solução e centrifugadas a $20.000 \times g$ durante 30min a 25°C. O sobrenadante contendo o extrato de proteínas totais foi dividido em alíquotas e armazenado a -70°C até sua utilização. Uma alíquota foi diluída 10 vezes para quantificação. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford modificado (Bradford, 1976).

Para ensaios de *Western blotting* 1-DE, as formas promastigotas das linhagens de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao antimônio obtidas na fase exponencial de crescimento foram lavados em PBS por três vezes e o sedimento congelado a -70°C. Posteriormente, as massas de parasitos foram submetidas à extração de proteínas. O sedimento de parasitos foi resuspenso no tampão de lise pH 8.0, contendo 50mM NaCl, 20mM Tris-HCl, detergente NONIDET P-40 (SIGMA[®]) 1% e coquetel de inibidores de proteases (Roche[®]). Após incubação por dez min no gelo, os parasitos foram lisados por meio de choque térmico (03 ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio (N₂) líquido (-196°C) e banho a 37°C). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 350 x g por dez min a 4°C e o sobrenadante contendo as proteínas totais foi dosado, aliquotado e armazenado a -70°C.

3.3 Eletroforese bidimensional (2-DE)

Proteínas totais de *L. braziliensis* (500µg) e de *L. infantum* (700µg), em triplicata de cada amostra, foram solubilizadas em tampão de reidratação, para focalização isoeletrica (IEF), contendo 8M de ureia, 2M de tiourea, 4% de CHAPS, 0,0025% de azul de bromofenol, 0,2% (v/v) de anfólitos Bio-Lyte (pH 3-10, Bio-Rad) e 65mM de DTT para um volume final de 350µl. Na primeira dimensão, as proteínas solubilizadas foram aplicadas em fitas de gradiente de pH imobilizado (IPG) em gel de 17cm, pH 3-10 não linear ou pH 4-7 (*ReadyStrip IPG Strip* -BioRad), para reidratação. A focalização isoeletrica foi realizada utilizando-se o sistema *Protean IEF Cell* (Bio-Rad), com temperatura de 20°C e voltagem 50µA/fita. A reidratação passiva foi realizada durante 4h, seguida por uma reidratação ativa a 50V durante 12h. A focalização isoeletrica foi aumentada gradualmente de 500V por 1h, 1000V por 1h, 8000V por 2h até 8000V/h e a corrida realizada até o acúmulo de 40.000V/h, a 20°C, 50µA/gel. As fitas de IPG foram equilibradas durante 15min a TA sob agitação em um tampão de equilíbrio redutor contendo 6M de ureia, 30% de glicerol v/v, 2% SDS, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 0,001% de azul de bromofenol e 130mM DTT, e por mais 15min em tampão de equilíbrio alquilante contendo 135mM de iodoacetamida. As fitas de IPG e o padrão de peso molecular (*Broad Range Unstained SDS-PAGE Standard*, Bio-Rad) foram aplicados nos géis 12% SDS-PAGE e selados com 0,5% de agarose. A segunda dimensão da separação eletroforética foi realizada em um sistema *Protean II XL Multi-Cell* (Bio-Rad), conectado a um banho de refrigeração Multitemp II (GE Healthcare) a 16°C. A eletroforese foi realizada sob uma tensão constante de 50V durante a primeira hora e, em seguida, sob 200V, até o corante atingir o final do gel. Para visualização dos *spots* proteicos, os géis foram

corados com Coomassie Blue coloidal G-250 (Neuhoff et al., 1988). Em teste anteriores foram utilizados as mesmas concentrações de proteínas totais, no entanto, as concentrações acima apresentaram melhor resultado para as respectivas amostras.

3.4 Análise de imagem

Os géis foram escaneados usando o equipamento *Calibrated Densitometer* GS-800 (Bio-Rad) e submetidos à análise pelo programa **PDQuest™** versão 7.3.0 (BioRad). Cada gel da triplicata das linhagens de *L. braziliensis* ou *L. infantum* sensíveis e resistentes foi escaneado individualmente. As imagens de cada gel digitalizadas foram calibradas para a análise. Depois que o *spot* de referência foi selecionado em uma das imagens das triplicatas, estas imagens foram normalizadas e processadas em grupos de réplicas. Nesta etapa, foram selecionados os parâmetros de detecção dos *spots* proteicos e foi realizada a detecção automática. Foram eliminados manualmente os “falsos” *spots*, detectados pelo programa, mas não correspondiam a *spots* proteicos no gel. Posteriormente, foram feitas as análises qualitativa, quantitativa e estatística dos *spots* detectados e alinhados. A massa molecular das proteínas foi determinada utilizando padrões comerciais (*Broad Range-Molecular Weight Marker, BioRad*) presentes em cada gel. Proteínas utilizadas como controle, as tubulinas, foram localizadas e anotadas. As imagens do gel foram calibradas em relação ao pI (ponto isoelétrico) e Mr (massa molecular relativa), permitindo a determinação das propriedades físico-químicas das proteínas de interesse.

Nas análises de expressão diferencial foram consideradas diferenças quantitativas significativas aquelas proteínas que apresentaram uma razão entre as intensidades dos mesmos *spots* com valores $\geq 2,0$. Com base neste parâmetro, foram considerados os resultados da média de intensidade de três géis, contendo proteínas provenientes de extrações e réplicas biológicas independentes. Além disso, procedeu-se à análise estatística dos *spots* com base no teste *t-Student* ($p \leq 0.05$). Dessa forma, foi avaliada a expressão diferencial significativa para cada triplicata, considerando os pares das linhagens sensíveis (S) e resistente (R) de Lb e Lc e as faixas de pH 4-7. Somente foram retirados dos géis aqueles *spots* em que a expressão diferencial era aumentada em mais de duas vezes no par sensível ou resistente e em que essa diferença era estatisticamente significativa com base no teste *t-Student* ($p \leq 0.05$).

3.5 Identificação de proteínas

Os *spots* proteicos selecionados como diferencialmente expressos entre as linhagens de *L. braziliensis* ou de *L. infantum* resistentes e sensíveis ao antimonial e também aqueles únicos em uma das linhagens foram manualmente retirados diretamente dos géis de SDS-PAGE das réplicas coradas com azul de Coomassie coloidal. Posteriormente, eles foram descorados completamente em 50% (v/v) de acetonitrila (ACN) (Fisher Scientific)/25mM NH_4HCO_3 (Sigma) pH 8.0. Os fragmentos dos géis foram desidratados em acetonitrila 100% e completamente secos num SpeedVac (Eppendorf). A digestão com tripsina foi realizada utilizando 20 μg / ml de tripsina modificada (Sequencing grade, Promega, Madison, WI), em 25mM NH_4HCO_3 pH 8,0 a 37 °C durante 24h. Os peptídeos tripsinizados foram extraídos com 5% (v/v) de ácido fórmico (Merck)/50% (v/v) de acetonitrila. Em seguida, os peptídeos foram concentrados em SpeedVac para um volume de 10 μl e armazenados a -20 °C. Posteriormente, 40 μl de 25mM NH_4HCO_3 pH 8,0 foram adicionados aos peptídeos, e esses foram submetidos à concentração em SpeedVac para um volume de 10 μl . Os peptídeos foram submetidos à análise de espectrometria de massa no Laboratório de Proteômica, Centro de Biotecnologia e Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil. Os espectros de MS/MS dos peptídeos foram obtidos por cromatografia líquida acoplada a um sistema de espectrometria de massas *in tandem* com injeção por *eletrospray* (LC-ES-MS/MS).

3.6 Espectrometria de massa

Após a extração, os peptídeos foram analisados pela técnica de nanocromatografia acoplada ao espectrômetro de massa (nanoLC/MS/MS). Nesta etapa, foi utilizado o sistema de cromatografia UPLC nanoAcquity (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado ao espectrômetro ortogonal Micromass Q-TOFmicro (Waters, Milford, MA, EUA).

Os peptídeos foram dessalinizados utilizando uma pré-coluna *Symmetry* C18 (180 μm de diâmetro interno \times 20mm de comprimento, partículas de 5 μm). Em seguida, fracionados por cromatografia de fase reversa, utilizando-se uma coluna analítica C18 (100 μm x 100mm, 1.7 μm) em um nanoACQUITY UPLC (Waters, Mildford, MA, EUA). O fluxo de carga utilizado foi de 0,6 μl / min com 50min/por corrida e 4 μl de cada amostra foram utilizados na análise. A eluição sequencial dos peptídeos foi realizada utilizando-se gradiente de água/ACN (1% por 1min, 1% a 50% por 40min, e 50% a 85% por 5min). Os peptídeos eluídos foram ionizados num capilar a 3000V (Micromass Q-Tof MicroTM), fragmentados no modo íon positivo (com a seleção de uma intensidade relativa de pelo menos 10 contagens) e os três

íons mais intensos (scan/s) foram analisados com a energia de colisão variando entre 20eV e 95eV de acordo com relação massa/carga (m/z) dos peptídeos. A duração da corrida para cada amostra foi de 30min com um fluxo de 0,6µl/min. Os peptídeos foram introduzidos ao quadrupolo do espectrômetro de massas Q-TOFmicro após ionização pela sonda de *electrospray* do mesmo. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e dessolvatação, e argônio como gás de colisão.

Os espectros MS/MS gerados foram analisados utilizando-se o algoritmo *MaxEnt* do software *Masslynx V 4.1* (Micromass, UK), os quais resultaram em uma lista de massas que foram analisadas pelo software *Protein-Lynx Global Server (PLGS) 4.2* (Waters, Mildford, MA, EUA), configurado para digestão trípica com perda de um sítio de clivagem, tolerância de erro igual a 30ppm e 0,3Da na massa dos peptídeos, construídas pelo método de sequenciamento de novo e pesquisados no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Subsequentemente, as sequências dos peptídeos foram pesquisadas contra a base de dados NCBItr (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Swissprot (<http://expasy.org/tools/tagdent.html>). Além disso, os espectros de MS/MS resultantes foram novamente submetidos à análise, usando-se o software MASCOT (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros da pesquisa foram: perda de até dois sítios de clivagem, massas monoisotópicas com peso molecular de proteínas irrestrito e tolerância de erro na massa de peptídeo e fragmento de 0,3Da e 0,1Da, respectivamente. Carboxamidometilação parcial da cisteína e oxidação da metionina também foram consideradas na análise.

Uma proteína foi considerada como tendo uma boa identificação se pelo menos um peptídeo apresentou “match” de confiança com alguma sequência no banco de dados com *score* MASCOT para peptídeos individuais superior a 51, considerado estatisticamente significativo para a identidade ($p < 0,05$). Durante a pesquisa, para evitar a identificação de falso positivo, cada vez que uma sequência de proteína foi analisada a partir do banco de dados alvo, sequências aleatórias de aminoácidos do mesmo tamanho foram geradas automaticamente e testadas usando a função “Decoy”, como um parâmetro de pesquisa no software MASCOT. Resultados falsos positivos não foram observados em nossas análises. Quando essa análise identificou peptídeos correspondentes às proteínas hipotéticas, as sequências foram então submetidas à análise BLAST do NCBI, para investigar uma função provável.

As proteínas foram agrupadas de acordo com seu processo biológico conforme o *Gene Ontology (GO)* para proteínas de *L. braziliensis* e *L. infantum* disponíveis na base de

dados GeneDB (<http://www.genedb.org>). Os resultados foram também confirmados no banco de dados KEGG Orthology (KO) (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>).

3.7 Análise da expressão das proteínas por *Western blotting*

Extratos de proteínas (20µg), obtidos como descrito anteriormente, foram aplicados em fitas IPG de 7cm com faixa de pH 3-10 não linear ou pH 5-8 (BioRad) e submetidos à focalização isoeétrica, utilizando-se o sistema *Protean IEF Cell* (Bio-Rad). A reidratação passiva foi realizada durante 4h, a 20°C e 50µA/fita, seguida por uma reidratação ativa a 50V durante 12h. A voltagem da focalização isoeétrica foi aumentada gradualmente até 4000V e a corrida realizada até o acúmulo de 16.000V/h. Subsequentemente, a segunda dimensão para a separação das proteínas por eletroforese foi realizada em gel SDS-PAGE 12% ou 15% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em PBS contendo 0,05% de Tween-20 durante 1h à temperatura ambiente (TA).

Posteriormente, as membranas foram incubadas durante 16h a 4°C em solução de bloqueio com anticorpos policlonais de coelho específicos para cada proteína de interesse: anti-pteridina redutase de *L. major* (1:100) (gentilmente cedido pelo Dr. Stephen Beverley, Universidade de Washington, EUA), antitriparedoxina peroxidase de *T. cruzi* (1:500) (Nogueira et al., 2009) e anticiclofilina-A de *T. cruzi* (1:5000) (gentilmente cedido pelo Dra. Jaqueline Bua, Universidade de Buenos Aires, Argentina). As membranas foram lavadas três vezes em PBS Tween-20 e, em seguida, incubadas durante 1h com peroxidase conjugada com antiIgG de coelho (GE Healthcare), diluído a 1:2000 em solução de bloqueio. As membranas foram lavadas, incubadas com substrato quimioluminescente ECL Plus (GE Healthcare) e expostas a filme de raios-X. Como controle positivo, os géis SDS-PAGE contendo as mesmas amostras foram corados com azul de Coomassie coloidal G-250 (Neuhoff et al. 1988West). Para as análises de *Western blotting* 1-DE, foi utilizado anticorpo antialfatubulina monoclonal (1:10.000) (Sigma, St. Louis, EUA) como normalizador. A intensidade das bandas foi analisada utilizando-se o software ATLAS PB 2.0.

Foi realizada a análise comparativa das sequências de aminoácidos das proteínas ciclofilina-A e triparedoxina peroxidase de *L. braziliensis* e *L. infantum* comparada com as sequências dessas proteínas de *T. cruzi*, usando-se o tritrypDB e o BLAST. Além disto, foi realizado o alinhamento das sequências de aminoácidos de pteridina redutase de *L. major*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, para verificar a porcentagem de identidade entre elas.

4 RESULTADOS

4.1 Análise proteômica

4.1.1 Perfil eletroforético em gel bidimensional (2-DE) em gradiente de pH imobilizado (IPGs)

Proteínas totais das formas promastigotas na fase exponencial de crescimento das linhagens LbWTS, LbSbR, LcWTS e LcSbR foram inicialmente aplicadas em fitas IPG de 17cm com gradiente de pH 3-10NL. Os resultados mostraram que a maioria dos *spots* proteicos se concentrou na região de pH entre 4 a 7 (Fig. 4). Devido a esse resultado, fitas de IPG nesta faixa de pH 4-7 foram utilizadas para construir o mapa 2-DE de linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* (Fig. 5). Os resultados mostraram que os perfis de proteínas obtidos em géis 2-DE foram altamente reprodutíveis em relação ao número total, à localização e à intensidade dos *spots*. Neste estudo, foram obtidas imagens dos géis 2-DE de cada linhagem resistente e sensível de *L. braziliensis* (Fig. 6) e *L. infantum* (Fig. 7), em triplicata de réplicas biológicas independentes e em gradiente de pH 4-7.

4.1.2 Análise das imagens e seleção dos *spots*

A análise das imagens foram realizadas utilizando-se o software Discovery Series PDQuestTM (Version 8.0 2D; Bio-Rad) de três géis 2-DE, obtidos numa mesma corrida eletroforética a partir de três réplicas biológicas independentes. Neste estudo, foram avaliadas as diferenças entre os géis de cada grupo mediante a análise de correspondência dos *spots*. No entanto, de acordo com parâmetros de detecção automática previamente estabelecidos, os *spots* que estavam em regiões extremas de pH, na região de baixo peso molecular, muito fracos e difíceis de serem individualizados, foram descartados desta análise das imagens.

A análise comparativa das imagens mostrou reprodutibilidade dos resultados dentro do mesmo grupo e semelhança de 84% e 83%, entre géis das triplicatas dos grupos sensíveis e resistentes de *L. braziliensis* e de *L. infantum*, respectivamente. As diferenças entre as intensidades calculadas dos *spots* dos géis normalizados foram estabelecidas por comparação pareada automática. Em seguida, foram eliminados por edição manual aqueles *spots* detectados pelo programa, mas que não foram visualizados nos géis. Nesta análise, foi gerada uma composição sintética, o gel *Master*, construída automaticamente a partir da intensidade média de cada *spot* pareado e utilizando-se como base a imagem de melhor qualidade das triplicatas analisadas (Fig. 6 e 7). Os números *Standard Spot* (SSP) são únicos e designados automaticamente a cada *spot* presente no gel *Master* de *L. braziliensis* (Fig. 8A) e de *L. infantum* (Fig. 8B).

A partir dos dados gerados, foi feita uma análise quantitativa, considerando a razão da média das densidades dos *spots* proteicos entre as réplicas de *L. braziliensis* LbWTS e LbSbR e *L. infantum* LcWTS e LcSbR, na qual foram considerados *spots* com diferença quantitativa significativa com valores iguais ou maiores que 2 e menores ou iguais a -2. Foram selecionados 67 e 60 *spots* diferencialmente expressos entre as linhagens sensíveis e resistentes de *L. braziliensis* (Fig. 8A) e *L. infantum* (Fig. 8B), respectivamente. Os gráficos (Fig. 9) mostram a dispersão da média da intensidade de cada *spot*, sendo analisados no total 360 e 320 *spots* proteicos entre os pares sensíveis e resistentes de *L. braziliensis* (Fig. 9A) e *L. infantum* (Fig. 9B), respectivamente. Os *spots* mais abundantes em uma das linhagens aparecem separados pelas linhas de corte. Aqueles localizados acima da linha de corte vermelha representam os *spots* mais abundantes nas linhagens resistentes LbSbR e LcSbR e os *spots* localizados abaixo da linha de corte azul representam os mais abundantes nas linhagens sensíveis LbWTS e LcWTS. Representados entre as duas linhas estão os *spots* proteicos que não apresentam diferença na média das densidades ou apresentam valores menores que 2,0.

A análise comparativa das imagens dos géis 2-DE mostrou diferença significativa dos perfis proteômicos entre as duas espécies de *Leishmania* analisadas, pertencentes a diferentes subgêneros (Fig. 5). O número de *spots* proteicos diferencialmente expressos analisados por par de amostras de *Leishmania* (Resistente/Sensível) foi de 360 *spots* para *L. braziliensis* e 320 para *L. infantum*.

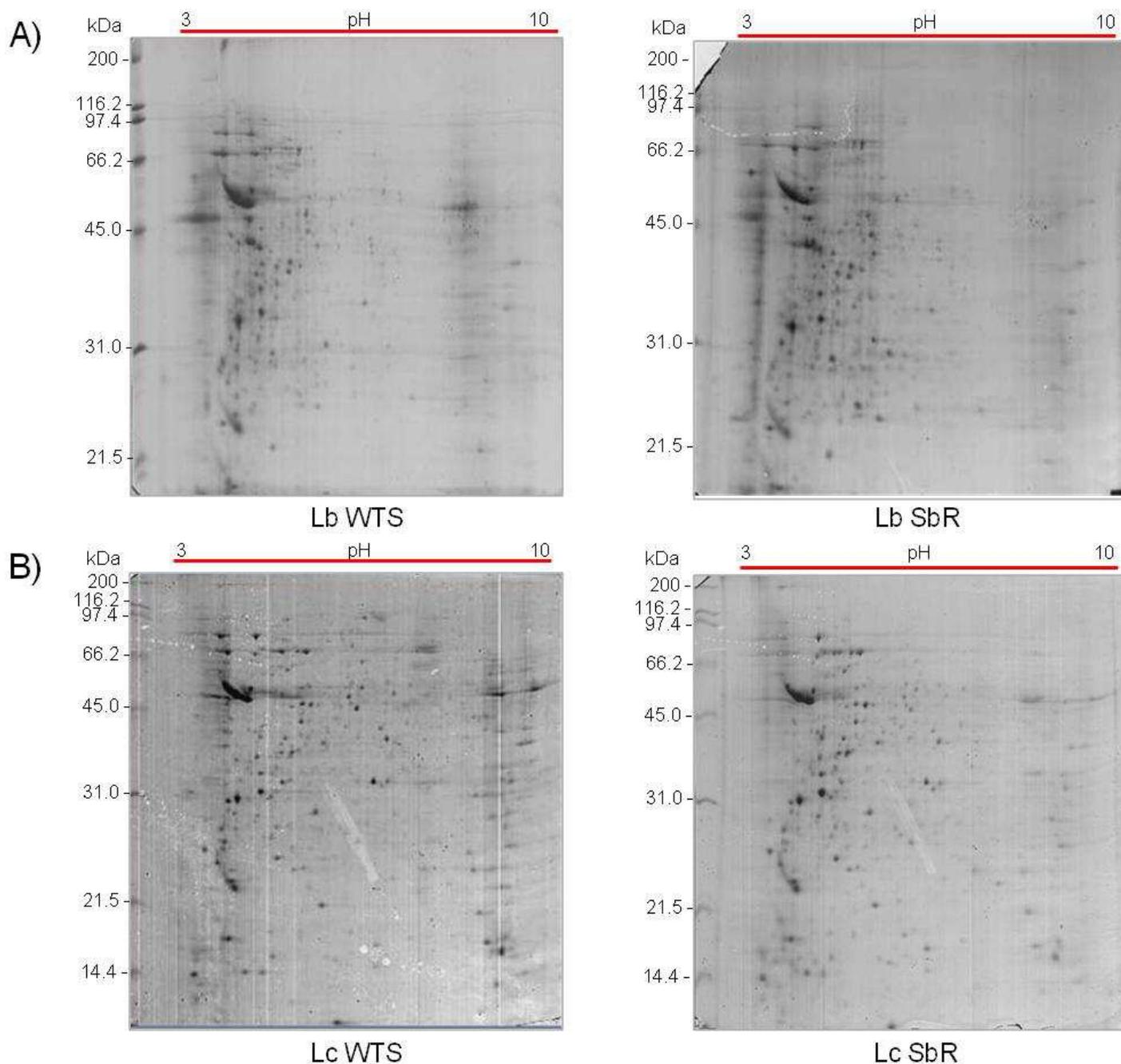


Figura 4- Perfil 2-DE, pH 3-10 NL, de extratos proteicos de linhagens de *L. braziliensis* (A) e de *L. infantum* (B) resistentes SbR e sensíveis WTS ao tartarato potássico de antimônio (SbIII). IEF foi realizada com 500 μ g de extratos proteicos de *L. braziliensis* (A) e com 700 μ g proteína de *L. infantum* (B) utilizando tiras IPGs de 17cm pH 3-10NL, submetidos à SDS-PAGE em géis de poliacrilamida a 12% e corados com azul de Coomassie coloidal G-250.

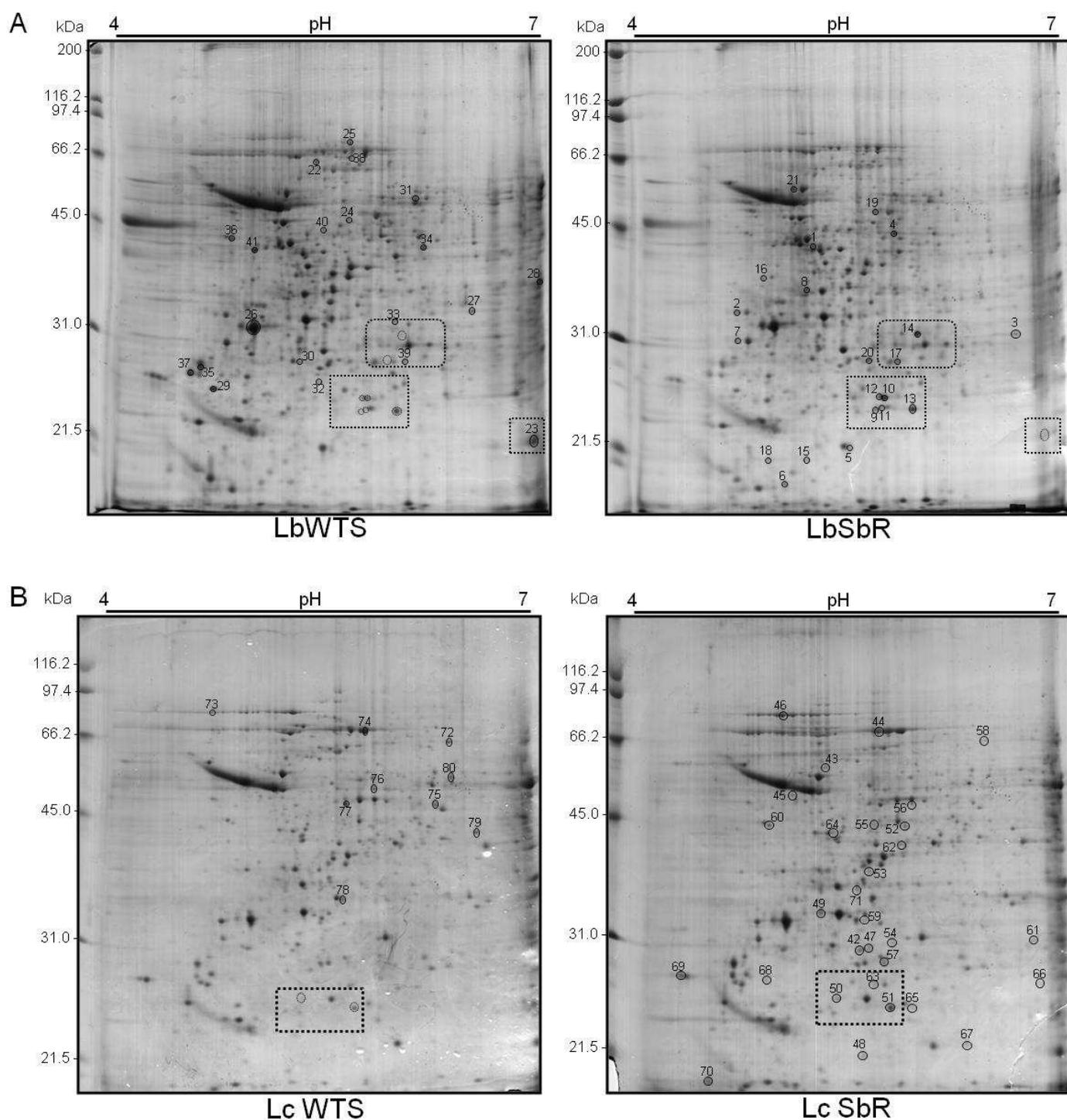


Figura 5- Perfil 2-DE, pH 4-7, de extratos proteicos de linhagens de *L. braziliensis* (A) e de *L. infantum* (B) sensíveis WTS e resistentes SbR ao tartarato potássico de antimônio (SbIII). IEF foi realizada com 500µg de proteínas de *L. braziliensis* (A) e com 700µg proteína de *L. infantum* (B) utilizando tiras IPGs de 17cm pH 4-7, submetidos à SDS-PAGE em géis de poliacrilamida a 12% e corados com azul de Coomassie coloidal G-250. Spots circulosos correspondem às proteínas exclusivas/mais abundantes. Os números referem-se ao local de identificação utilizados nas Tabelas 2 e 3. As regiões marcadas com quadrados apresentam spots diferencialmente expressos e foram ampliadas nas Fig. 12 e 13. Cada gel é representativo de três repetições biológicas.

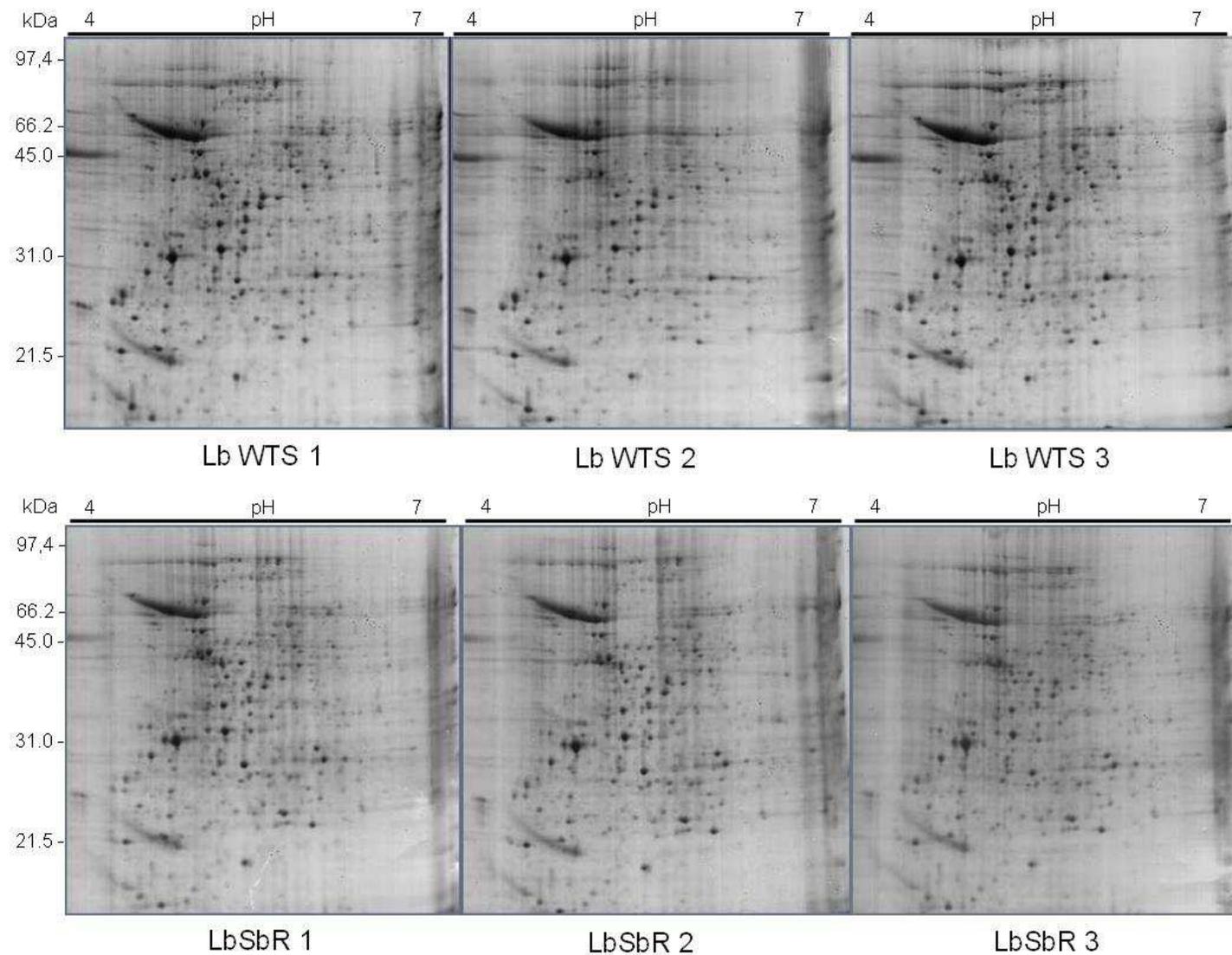


Figura 6- Triplicatas 2-DE de extratos proteicos de linhagens de *L. braziliensis* sensíveis WTS e resistentes SbR ao tartarato potássico de antimônio (SbIII). IEF foi realizada com 500µg de proteínas de *L. braziliensis* utilizando tiras IPGs de 17cm pH 4-7, submetidos à SDS-PAGE em géis de poliacrilamida a 12% e corados com azul de Coomassie coloidal G-250. As imagens dos géis foram digitalizadas, normalizadas e analisadas em triplicatas.

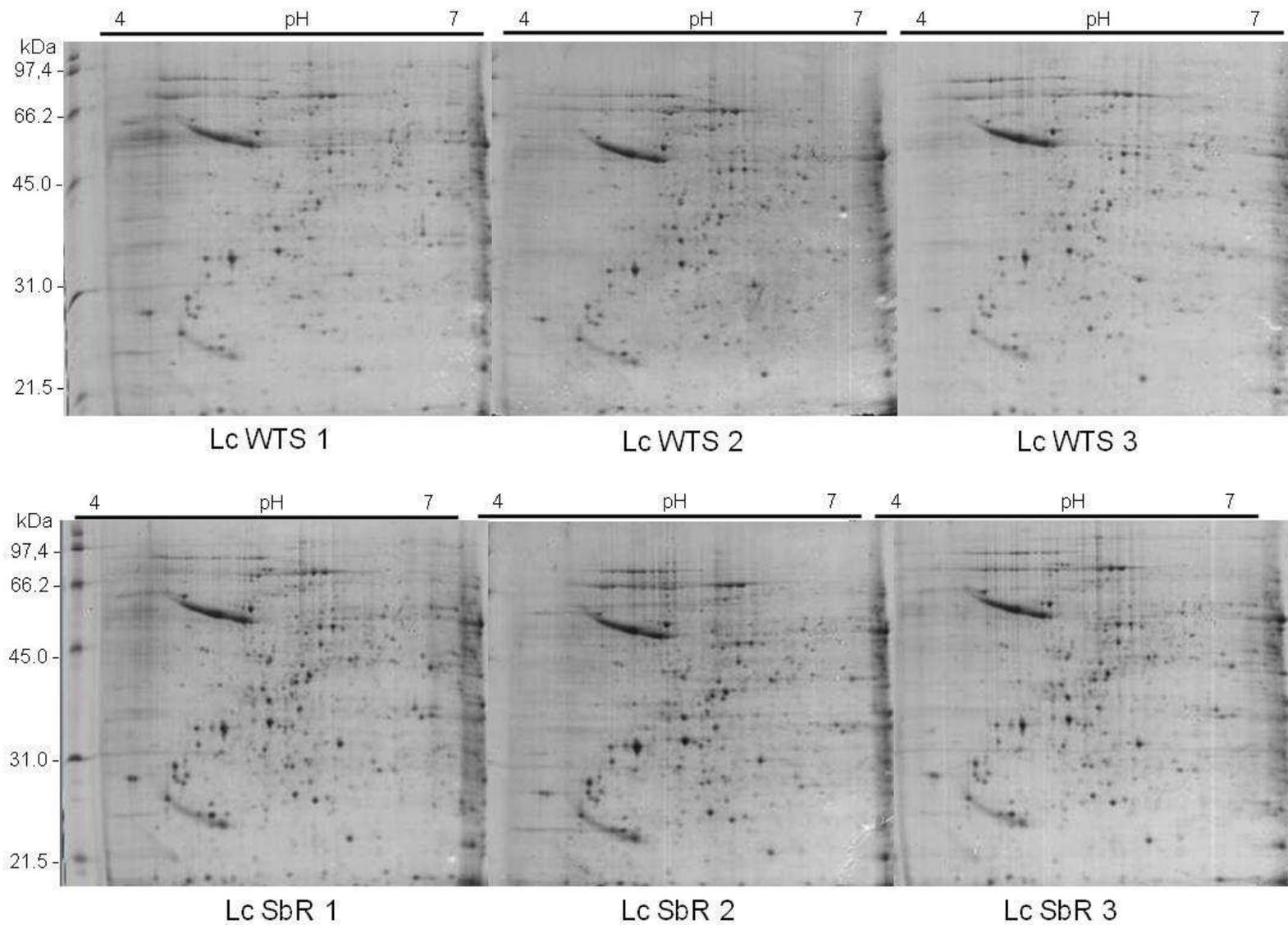


Figura 7- Triplicatas 2-DE de extratos proteicos de linhagens de *L. infantum* sensíveis WTS e resistentes SbR ao tartarato potássico de antimônio (SbIII). IEF foi realizada com 700µg de proteína de *L. infantum* utilizando tiras IPGs de 17cm pH 4-7, submetidos à SDS-PAGE em géis de poliacrilamida a 12% e corados com azul de Coomassie coloidal G-250. As imagens dos géis foram digitalizadas, normalizadas e analisadas em triplicata.

A Tabela 1 mostra: número total de *spots* exclusivos e mais abundantes em cada uma das amostras; número de *spots* submetidos à análise de LC/MS/MS; e *spots* identificados em cada grupo. Na linhagem sensível de *L. braziliensis* (LbWTS), 66 *spots* foram exclusivos ou mais abundantes. Este número foi maior do que aquele encontrado no seu par resistente (LbSbR), que apresentou 53 *spots* exclusivos/mais abundantes.

Curiosamente, LcSbR apresentou 60 *spots* exclusivos/mais abundantes e o seu par sensível apresentou 13 *spots*. Em todas as amostras de *Leishmania* analisadas, 192 *spots* foram exclusivos (únicos) e mais abundantes, sendo que 132 *spots* foram submetidos à análise LC/MS/MS para a identificação de proteínas, uma vez que eles apresentaram perfis bem definidos e reprodutíveis. Destes 132 *spots*, 80 foram identificados, correspondendo a 57 proteínas distintas.

Tabela 1- Análise qualitativa e quantitativa dos perfis 2-DE de proteínas de linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* resistentes e sensíveis ao antimonial.

Amostra de <i>Leishmania</i>	<i>spots</i> /gel	<i>Spots</i>		MS/MS ^c	ID ^d
		Exclusivo (único) ^a	Mais abundantes ^b		
LbWTS	360	46	20	26	20
LbSbR		10	43	39	21
LcWTS	320	2	11	13	09
LcSbR		27	33	54	30
Total		85	107	132	80

^a Presente em uma das amostras do par resistente (SbR) ou sensível (WTS). ^b Presente em ambas as amostras do par, mas com diferença nas intensidades dos *spots* de pelo menos duas vezes e teste t*Student $p < 0,05$. ^c MS/MS, *spots* submetidos à espectrometria de massa. ^d ID, número de proteínas identificadas.

4.2 Agrupamento das proteínas identificadas por espectrometria de massas em classes com base nos processos biológicos anotados em banco de dados

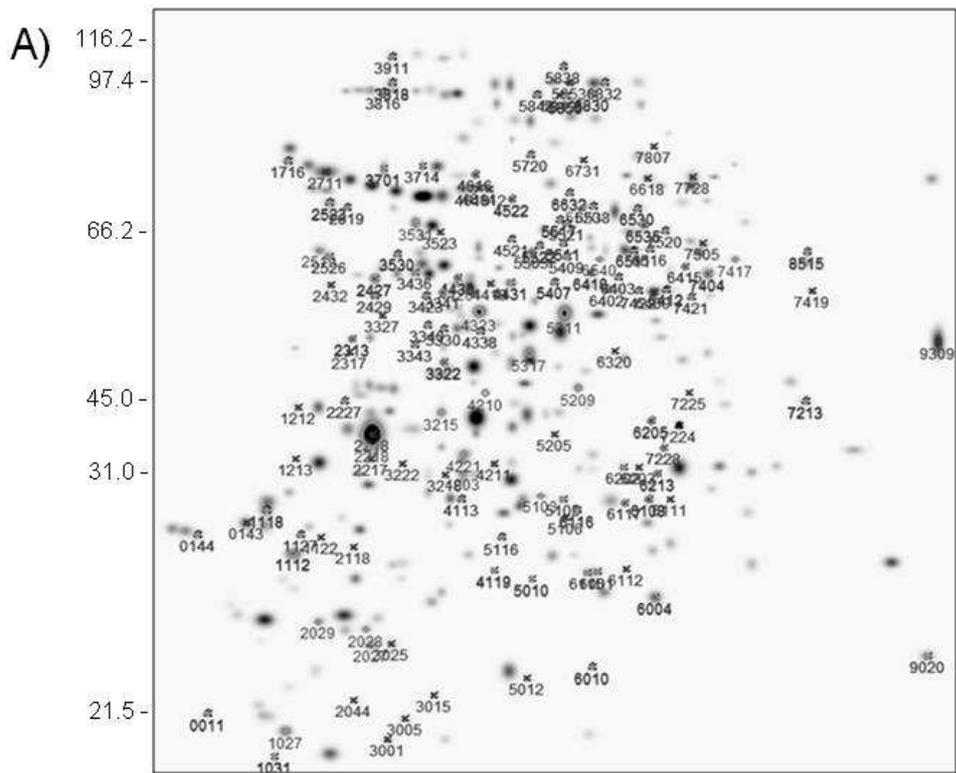
Os espectros MS/MS gerados a partir da análise individual de cada *spot* proteico foram analisados, utilizando-se o algoritmo *MaxEnt* do software *Masslynx* V 4.1, os quais resultaram em uma lista de massas moleculares que foram analisadas pelo software *Protein-Lynx Global Server* (PLGS) 4.2. Subsequentemente, as sequências dos peptídeos foram pesquisadas contra a banco de dados NCBIInr e SwissProt. No entanto, esta pesquisa não foi suficiente para a identificação da lista de peptídeos pesquisada. Em seguida, os dados de MS/MS resultantes foram submetidos a uma nova análise de dados, usando-se o software MASCOT (Matrix Science, London, UK). Foram submetidos à análise LC/MS/MS, 132 *spots* proteicos. Destes, 80 tiveram resultados que atenderam aos parâmetros estabelecidos para a pesquisa, sendo, portanto, consideradas como proteínas identificadas.

As proteínas identificadas foram pesquisadas nos bancos de dados e agrupadas de acordo com as anotações de seu processo biológico segundo o *Gene Ontology* (GO) para proteínas de *L. braziliensis* e *L. infantum* disponíveis na base de dados GeneDB. Os resultados foram também confirmados no banco de dados KEGG Orthology (KO). As proteínas identificadas por classe funcional estão listadas na Tabela 2. Este agrupamento mostrou que as 80 proteínas identificadas correspondem a 57 proteínas distintas. Nas Tabelas 3 e 4, estão listadas as proteínas identificadas, agrupadas por classe, com base nos processos biológicos anotados no GeneDB: a) dobramento de proteínas/chaperoninas e proteínas de estresse, b) proteínas de citoesqueleto, c) proteínas antioxidantes/desintoxicação, d) processamento de RNA/DNA, e) biossíntese de proteínas, f) enzimas metabólicas: glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)/fosforilação oxidativa, metabolismo de aminoácidos/proteólise, fosforilação, metabolismo de cofatores e vitaminas, metabolismo de ácidos graxos, transdução de sinal; e g) proteínas hipotéticas.

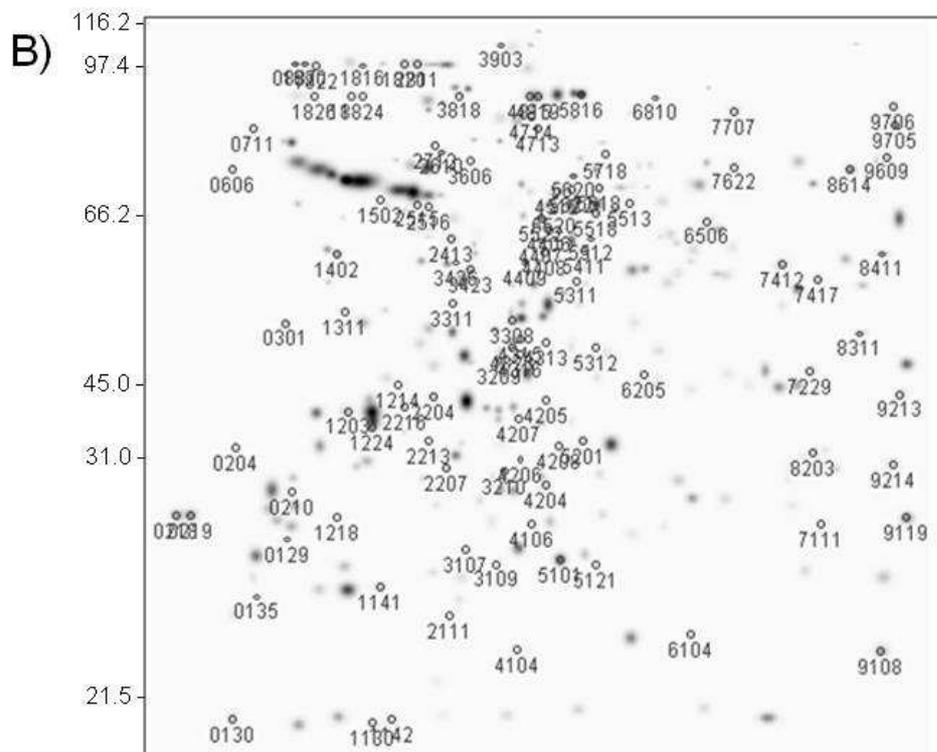
Tabela 2- Número de proteínas identificadas em cada linhagem de *Leishmania* spp., agrupadas com base nos processos biológicos.

Processos Biológicos	LbWTS	LbSbR	LcWTS	LcSbR
Dobramento de proteínas/chaperonas e proteínas de estresse	2	3	3	5
Proteínas de citoesqueleto	3	5	-	3
Proteínas antioxidantes/desintoxicação	-	7	-	2
Processamento de RNA/DNA	1	1	1	-
Biossíntese de proteínas	2	2	1	1
Enzimas metabólicas	8	3	4	11
Proteínas hipotéticas	4	-	-	8
Total de proteínas identificadas por linhagem	20	21	9	30

- Nenhuma proteína identificada no processo biológico avaliado.



MASTER LbWTS x LbSbR



MASTER LcWTS x LcSbR

Figura 8- Imagem do gel *Master* construído a partir da análise pareada das imagens dos grupos de réplicas das linhagens LbWTS versus LbSbR (A) e LcWTS versus LcSbR (B). Composição sintética construída a partir da análise pareada das imagens dos grupos de réplicas. Os números *Standard spot* (SSP) foram criados automaticamente pelo programa PDQuest, que divide o *Master* em linhas e colunas. Os dois primeiros dígitos do número SSP de um *spot* corresponde a seção X e a coordenada Y. A) LbWTS versus LbSbR; B) LcWTS versus LcSbR.

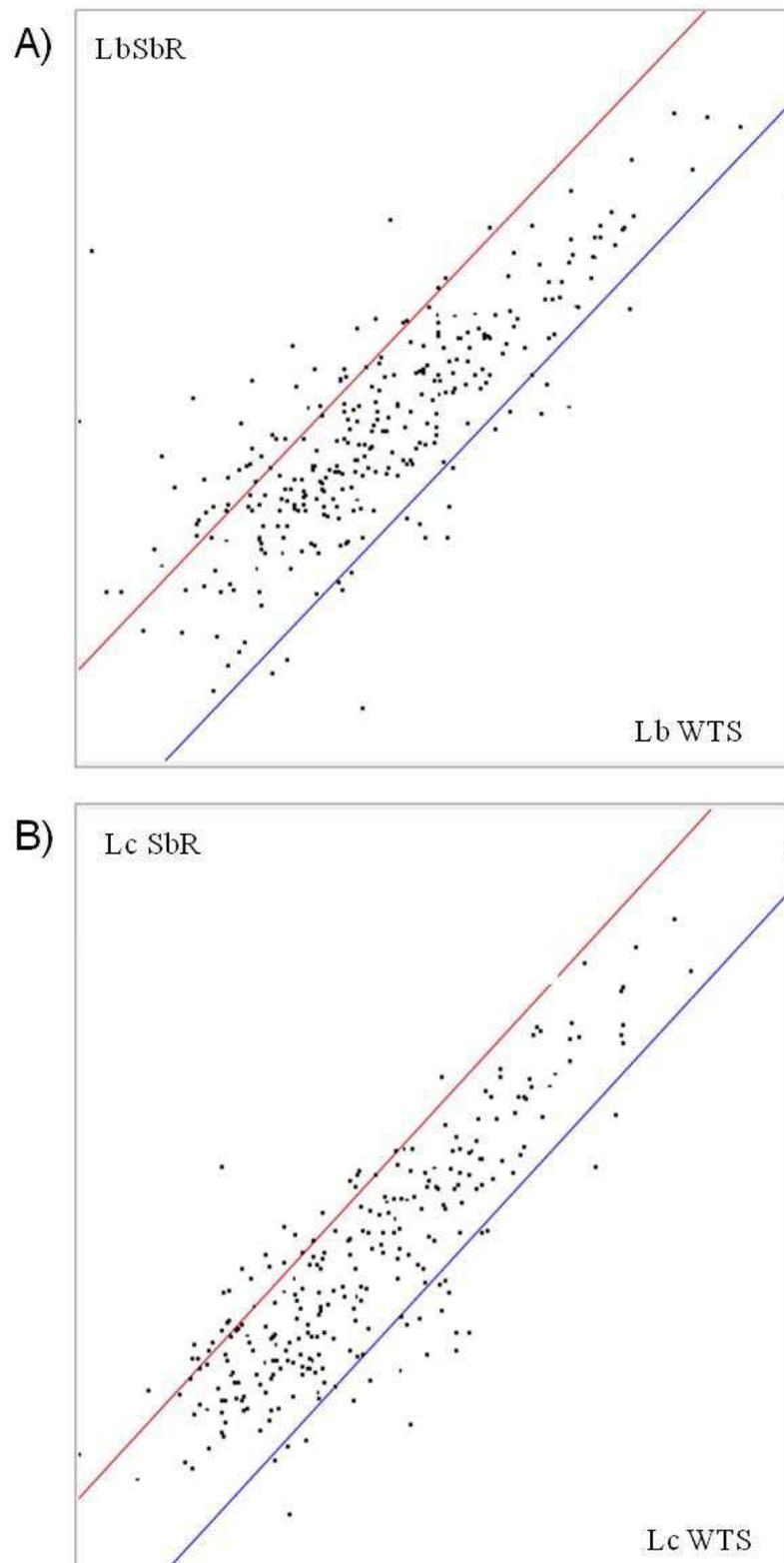


Figura 9- Representação gráfica da dispersão dos *spots* únicos/mais abundantes nas linhagens LbWTS e LbSbR (A), LcWTS e LcSbR (B). Análise quantitativa da intensidade dos *spots* foi realizada utilizando-se o programa PDQuest 7.3.0. A intensidade dos *spots* foi normalizada e o gráfico foi gerado automaticamente, considerando uma diferença de 2x. Representados entre as duas linhas estão os *spots* que não têm diferença de expressão ou apresentam valores menores que 2,0. Os *spots* aparecem separados pelas linhas de corte, sendo que os mais abundantes nas linhagens resistentes LbSbR e LcSbR estão localizados acima da linha de corte vermelha. Os *spots* localizados abaixo da linha de corte azul representam os mais abundantes nas linhagens sensíveis LbWTS e LcWTS. No total, foram analisados 360 e 320 *spots* entre as linhagens sensíveis e resistentes de *L. braziliensis* (A) e *L. infantum* (B), respectivamente.

Tabela 3- Proteínas diferencialmente expressas nas linhagens resistentes (LbSbR) ou sensíveis (LbWTS) de *L. braziliensis* comparado com seus respectivos pares.

<i>Spot</i> <i>n</i> ^a	Razão ^a LbSbR/ LbWT	Proteína identificada	N ^o Acesso TriTrypDB <i>L. braziliensis</i>	M _r ^b	pI ^c	score MASCOT ^d	% Cobertura/ Matches ^e	Ref. ^f
(continua)								
* Dobramento de proteínas/chaperonas e proteínas de estresse								
1	2.6	Heat shock protein 83-1	LbrM33.0340	80532/ 44.96	5.04/4.97	669	21 / 20 (4)	24, 25
2	2.5	Chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor	LbrM35.2250	59382/ 33.91	5.5/4.46	460	20 / 8 (5)	26
3	2.0	Heat shock protein 70-related protein	LbrM26.1260	70879/ 47.02	6.65/ -	365	20 / 12 (2)	24-26, 28
Proteínas de citoesqueleto								
4	U	Alpha-tubulin	LbrM13.0190	49684/ 43.48	4.65/5.65	562	35 / 17 (5)	26, 28
5	U	Alpha-tubulin	LbrM13.0190	49684/ 18.17	4.65/5.19	118	7 / 3 (1)	26, 28
6	2.2	Alpha-tubulin	LbrM29.2700	28689/ 15.74	4.89/4.75	346	11 / 9 (3)	26, 28
7	U	Beta-tubulin	LbrM33.0920	49745/ 30.26	4.45/5.95	184	10 / 5 (2)	25-27
8	2.1	Beta-tubulin	LbrM33.0920	49745/ 37.42	4.45/4.92	652	30 / 9 (2)	25-27
Proteínas antioxidantes/desintoxicação								
9	U	Tryparedoxin peroxidase	LbrM15.1100	22572/ 21.80	6.9/5.36	63	4 / 1 (1)	
10	5.0	Tryparedoxin peroxidase	LbrM15.1100	22572/ 23.23	6.9/5.46	350	47 / 14 (2)	
11	4.2	Tryparedoxin peroxidase	LbrM15.1100	22572/ 22.08	6.9/5.43	100	11 / 2 (1)	
12	3.7	Tryparedoxin peroxidase	LbrM15.1100	22572/ 23.22	6.9/5.42	300	34 / 10 (3)	
13	2.1	Tryparedoxin peroxidase	LbrM15.1100	22572/ 21.91	6.9/5.74	151	19 / 5 (2)	
14	U	Pteridine reductase 1	LbrM23.0300	30689/ 31.08	5.56/5.8	382	31 / 5 (4)	
15	2.4	3-hydroxyacyl-ACP dehydratase, MaoC, putative	LbrM07.0450	27646/ 17.45	5.14/4.90	339	45 / 9 (5)	
Processamento de RNA/DNA								
16	2.7	Proliferative cell nuclear antigen (PCNA), putative	LbrM15.1440	32821/ 39.37	4.83/4.66	319	36 / 7 (3)	25
Biossíntese de Proteínas								
17	U	Seryl-tRNA synthetase	LbrM19.0220	53671/ 27.34	5.29/5.6	313	13 / 6 (3)	
18	U	Small ubiquitin protein, putative (SUMO)	LbrM08.0500	12361/ 17.21	4.98/4.67	99	20 / 2 (1)	
Enzimas metabólicas								
Glicólise								
19	2.0	Enolase	LbrM14.1330	46743/ 52.41	5.48/ 5.40	221	16 / 5 (1)	24, 25
Ciclo do ácido cítrico (TCA) e Fosforilação oxidativa								
20	2.2	Reiske iron-sulfur protein precursor, putative	LbrM34.1450	34045/ 27.54	6.02/5.30	305	24 / 11 (3)	
21	2.1	ATPase beta subunit, putative	LbrM25.1150	56398/ 57.26	5.19/4.86	963	48 / 26 (12)	28
<i>Spot</i> <i>n</i> ^a	Razão ^a LbWTS/ LbSbR	Proteína identificada	N ^o Acesso TriTrypDB <i>L. braziliensis</i>	M _r ^b	pI ^c	score MASCOT ^d	% Cobertura/ Matches ^e	Ref. ^f
* Dobramento de proteínas/chaperonas e proteínas de estresse								
22	7.8	Glucose-regulated protein 78, putative	LbrM28.1300	71780/ 66.73	5.18/5.22	1217	36 / 22 (14)	
23	3.5	Cyclophilin a	LbrM25.0790	18562/ 19.10	8.21/ -	409	63 / 13 (6)	
Proteínas de citoesqueleto								
24	U	Actin-like protein, putative	LbrM15.1280	6165/ 50.93	5.4/5.30	229	20 / 6 (1)	
25	4.0	Paraflagellar rod protein 1D	LbrM31.0160	69131/ 71.00	5.36/5.30	559	21 / 12 (7)	
26	3.7	Beta-tubulin	LbrM33.0920	49745/ 32.00	4.65/4.70	1485	42 / 53 (25)	25-27
Processamento de RNA/DNA								
27	2.9	RNA-binding protein, putative	LbrM34.2130	30283/ 34.51	7.85/6.46	557	39 / 14 (7)	26
Biossíntese de Proteínas								
28	2.2	Elongation factor 1-alpha	LbrM17.0090	48941/ 39.07	8.49/ -	680	35 / 25 (5)	26

<i>Spot</i> <i>n</i> ^a	Razão ^a LbWTS/ LbSbR	Proteína identificada	N ^o Acesso TriTrypDB <i>L. braziliensis</i>	<i>M_r</i> ^b	<i>pI</i> ^c	<i>score</i> MASCOT ^d	% Cobertura/ Matches ^e	Ref. ^f
29	2.0	Nascent polypeptide associated complex subunit-like protein, copy 1	LbrM04.0750	18196/ 24.25	4.45/4.45	181	40 / 5 (1)	26
Enzimas metabólicas								
Ciclo do ácido cítrico (TCA) e Fosforilação oxidativa								
30	U	ATPase beta subunit, putative	LbrM25.1150	56267/ 27.45	5.19/4.98	291	20 / 6 (4)	28
31	2.2	Vacuolar ATP synthase subunit B, putative	LbrM28.2630	55400/ 55.80	5.72/5.92	554	38 / 13 (5)	
Metabolismo de aminoácidos e proteólise								
32	U	Aminoacylase, N-acyl-L-amino acid amidohydrolase, putative	LbrM20.5930	43449/ 31.87	5.49/5.14	247	22 / 7 (1)	
33	U	Nitrilase, putative	LbrM26.2200	31381/ 32.95	6.45/ 5.70	340	37 / 7 (4)	
34	2.8	Glutamine synthetase, putative	LbrM06.0350	42220/ 45.33	5.71/6.00	432	32 / 14 (6)	
35	2.6	Cathepsin L-like protease	LbrM08.0830	47976/ 26.97	6.81/4.35	134	19 / 3 (1)	
Defosforilação								
36	3.0	Protein phosphatase, putative	LbrM25.0630	45867/ 47.04	4.71/4.58	809	43 / 19 (8)	26
Processo biológico desconhecido								
37	2.6	Surface antigen protein, putative	LbrM12.0750	96449/ 26.97	4.69/4.27	222	18 / 7 (3)	
Proteínas hipotéticas								
38	U	Hypothetical protein, conserved	LbrM09.0120	65475/ 66.31	5.32/5.31	634	31 / 14 (5)	
39	U	Hypothetical protein, conserved	LbrM23.1530	27271/ 27.50	6.6/5.71	408	33 / 9 (4)	
40	U	Hypothetical protein, conserved	LbrM26.2570	43957/ 48.83	5.49/5.13	203	8 / 3 (2)	
41	2.2	Hypothetical protein, conserved	LbrM35.6250	41601/ 44.82	4.88/4.71	942	36 / 27 (14)	

*Anotações de processo biológico de acordo com bancos de dados Gene Ontology em GeneDB e KEGG Orthology; ^aRazão: abundância relativa de *spots* proteicos nas linhagens SbR e WTS, determinadas por densitometria usando-se o programa PDquest, SbR/WTS ou WTS/SbR; ^b *M_r*: massa molar - prevista (Da)/experimental (kDa); ^c *pI* - ponto isoelétrico - teórico/experimental; ^d MASCOT scores – pontuação global no MASCOT. (Uma proteína foi considerada como tendo uma boa identificação, se pelo menos um peptídeo apresentou “match” de confiança com alguma sequência no banco de dados com uma pontuação do MASCOT para peptídeos individuais superior a 51, que foi considerado estatisticamente significativo para a identidade ($p < 0,05$); ^e % Cobertura/ Matches - porcentagem de cobertura da sequência/número de peptídeos correspondentes. O número entre parênteses indica o número de peptídeos que atingiram probabilidade superior a 95%. Os espectros de massa foram pesquisados no banco de dados não redundante NCBI usando-se o software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). ^f Ref. - proteínas também identificadas por outras análises proteômicas em linhagens de *Leishmania* spp. resistentes ao Sb. U únicas, proteínas detectadas em apenas uma das amostras do par sensível e resistentes ao SbIII. *pI* (-) indica que o valor de *pI* não foi determinado na faixa de strip analisada pH4-7.

Tabela 4- Proteínas diferencialmente expressas nas linhagens resistentes (LcSbR) ou sensíveis (LcWTS) de *L. infantum*) comparado com seus respectivos pares.

Spot nº	Razão ^a LcSbR/ LcWT	Proteína identificada	Nº Acesso TriTrypDB <i>L. infantum</i>	M _r ^b	pI ^c	MASCOT score ^d	(continua)	
							% Cobertura/ Matches ^e	Ref. ^f
* Dobramento de proteínas/chaperonas e proteínas de estresse								
42	3.0	Heat-shock protein hsp70, putative	LinJ.28.3060	80730/ 24.27	5.73/5.48	294	9 / 6 (2)	24-26, 28
43	2.2	Heat shock protein, putative	LinJ.18.1350	92644/ 70.00	5.24/5.20	87	4 / 2 (1)	
44	2.1	Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor, putative	LinJ.30.2530	72119/ 71.49	5.7/5.62	708	26 / 16 (6)	24, 26
45	2.8	Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	LinJ.36.2140	59663/ 59.83	5.33/4.94	341	15 / 6 (4)	26
46	2.4	Heat shock protein 83-1	LinJ.33.0350	79249/ 84.32	5.14/4.87	547	17 / 12 (3)	24, 25
Proteínas de citoesqueleto								
47	U	Actin	LinJ.04.1250	42307/ 25.21	5.41/5.54	104	11 / 2 (1)	
48	U	Alpha-tubulin	LinJ.13.1450	36933/ 12.03	6.78/5.53	164	11 / 3 (1)	26, 28
49	2.9	Alpha-tubulin	LinJ.13.1450	36933/ 12.03	6.78/5.53	81	6 / 2 (1)	26, 28
Proteínas antioxidantes/desintoxicação								
50	3.5	Peroxiredoxin, putative / Tryparedoxin peroxidase	LinJ.23.0050	25582/ 18.14	6.43/5.320	160	27 / 4 (1)	
51	2.5	Peroxiredoxin, putative / Tryparedoxin peroxidase	LinJ.23.0050	25582/ 17.44	6.43/5.72	352	34 / 13 (5)	
Biossíntese de Proteínas								
52	2.6	Elongation factor 2	LinJ.36.0200	94942/ 50.56	5.77/5.83	290	7 / 5 (2)	26, 28
Enzimas metabólicas								
Glicólise								
53	U	Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit, putative	LinJ.25.1790	38448/ 37.77	5.64/5.54	250	28 / 8 (2)	
Ciclo do ácido cítrico (TCA) e Fosforilação oxidativa								
54	U	Inorganic pyrophosphatase, putative	LinJ.03.0890	25320/ 26.37	5.15/5.82	112	22 / 2 (1)	
55	U	Isocitrate dehydrogenase, putative	LinJ.33.2680	46583/ 48.51	5.43/5.56	118	12 / 3 (1)	
Metabolismo de aminoácidos e proteólise								
56	U	S-adenosylmethionine synthetase	LinJ.30.3560	43498/ 57.19	5.5/5.88	255	14 / 5 (3)	28
57	3.0	2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase, putative	LinJ.25.2090	30723/ 23.20	5.8/5.65	107	10 / 3(1)	
58	2.1	Aminopeptidase P1 (Metallo-peptidase, Clan MG, Family M24), putative	LinJ.02.0010	69409/ 71.45	5.6/6.14	273	9 / 5 (3)	26
Defosforilação								
59	U	Protein phosphatase 2C-like protein	LinJ.36.0560	33460/ 28.90	5.2/5.53	97	10 / 2 (1)	
60	2.7	Protein phosphatase, putative	LinJ.25.0780	45795/ 49.97	4.75/4.78	458	29 / 20 (6)	26
Metabolismo de Co-fatores e vitaminas								
61	2.2	Biotin/lipoate protein ligase-like protein	LinJ.31.1070	28946/ 25.82	6.07/6.78	138	16 / 3 (2)	
Metabolismo de ácidos graxos								
62	2.2	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase-like protein	LinJ.32.3810	39541/ 45.77	5.48/5.76	59	13 / 3 (1)	
Mediadora de transdução de sinal								
63	2.0	Rab7 GTP binding protein, putative	LinJ.18.0890	24298/ 20.26	5.27/5.59	57	4 / 1 (1)	28
Proteínas hipotéticas								
64	U	Hypothetical protein, conserved	LinJ.36.6170	41313/ 48.48	5.17/ 5.26	214	19 / 5 (3)	
65	U	Hypothetical protein, conserved	LinJ.32.0660	21190/ 17.07	5.61/5.88	142	19 / 4 (1)	

Spot n ^a	Razão ^a LcSbR/ LcWT	Proteína identificada	N ^o Acesso TriTrypDB <i>L. infantum</i>	M _r ^b	pI ^c	MASCOT score ^d	% Cobertura/ Matches ^e	Ref. ^f
66	U	Hypothetical protein, conserved	LinJ.35.1220	24796/ 20.14	6.43/6.83	99	27 / 3 (1)	
67	6.0	Hypothetical protein, conserved	LinJ.34.2410	22036/ 12.84	9.59/6.29	61	14 / 2 (1)	
68	2.8	Hypothetical protein, conserved	LinJ.27.1920	22432/ 20.76	4.73/4.77	160	11 / 2 (1)	
69	2.2	Hypothetical protein, conserved	LinJ.35.4540	21687/ 21.00	4.15/4.15	99	11 / 2 (1)	
70	2.0	Hypothetical protein, conserved	LinJ.26.1960	89762/ 90.90	4.99/4.36	144	6 / 3 (1)	
71	2.0	Hypothetical protein, conserved	LinJ.34.2530	28783/ 35.09	5.43/5.45	57	5 / 1 (1)	
Spot n ^a	Razão ^a LcWTS/ LcSbR	Proteína identificada	N ^o Acesso TriTrypDB <i>L. infantum</i>	M _r ^b	pI ^c	MASCOT score ^d	% Cobertura/ Matches ^e	Ref. ^f
* Dobramento de proteínas/chaperonas e proteínas de estresse								
72	6.0	Stress-induced protein sti1	LinJ.08.1020	62770/ 71.07	5.9/6.47	706	29 / 15 (3)	28
73	2.2	Heat shock protein 83-1	LinJ.33.0360	81013/ 84.81	5.08/4.62	777	24 / 14 (4)	24, 25
74	2.0	Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor, Putative	LinJ.30.2480	72089/ 72.20	5.8/5.81	1448	39 / 27 (8)	24-26, 28
Processamento de RNA/DNA								
75	2.0	RNA helicase, putative	LinJ.21.1820	59217/ 55.76	8.82/6.36	418	17 / 8 (4)	
Biossíntese de Proteínas								
76	2.0	Elongation factor 1-alpha	LinJ.17.0090	55768/ 62.18	9.51/5.89	148	11 / 5 (1)	26
Enzimas metabólicas								
Glicólise								
77	3.1	Enolase	LinJ.14.1240	46634/ 61.98	5.33/5.77	1247	65 / 50 (22)	24, 25
Ciclo do ácido cítrico (TCA) e Fosforilação oxidativa								
78	U	Reiske iron-sulfur protein precursor, putative	LinJ.35.1540	34046/ 33.43	5.91/5.69	251	30 / 7 (2)	
79	2.2	Succinyl-CoA ligase, putative [GDP-forming] beta-chain	LinJ.36.3100	44498/ 48.23	6.77/6.65	353	24 / 8 (2)	
Metabolismo de aminoácidos e proteólise								
80	4.2	Trypanothione reductase	LinJ.05.0350	53620/ 66.80	5.85/6.48	317	30 / 8 (1)	

*Anotações de processo biológico de acordo com bancos de dados Gene Ontology em GeneDB e KEGG Orthology; ^aRazão: abundância relativa de spots proteicos nas linhagens SbR e WTS, determinadas por densitometria usando-se o programa PDquest, SbR/WTS ou WTS/SbR; ^b M_r: massa molar - prevista (Da)/experimental (kDa); ^c pI - ponto isoelétrico - teórico/experimental; ^d MASCOT scores – pontuação global no MASCOT. (Uma proteína foi considerada como tendo uma boa identificação, se pelo menos um peptídeo apresentou “match” de confiança com alguma sequência no banco de dados com uma pontuação do MASCOT para peptídeos individuais superior a 51, que foi considerado estatisticamente significativo para a identidade ($p < 0,05$); ^e % Cobertura/ Matches - porcentagem de cobertura da sequência/número de peptídeos correspondentes. O número entre parênteses indica o número de peptídeos que atingiram probabilidade superior a 95%. Os espectros de massa foram pesquisados no banco de dados não redundante NCBI usando-se o software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>); ^f Ref. - proteínas também identificadas por outras análises proteômicas em linhagens de *Leishmania* spp. resistentes ao Sb. U únicas, proteínas detectadas em apenas uma das amostras do par sensível e resistentes ao SbIII.

4.3 Análise comparativa entre as linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* sensíveis e resistentes ao antimonial

Neste estudo, encontrou-se que 20 e 14 proteínas foram identificadas como únicas e/ou mais abundantes nas linhagens LbWTS e LbSbR, respectivamente. De outro lado, 9 e 27 proteínas únicas e/ou mais abundantes foram identificadas nas linhagens LcWTS e LcSbR. A análise proteômica comparativa (pH4-7) mostrou que diferentes *spots* correspondentes a uma mesma proteína foram encontrados nas linhagens resistentes e sensíveis de ambas as espécies de *Leishmania* analisadas (Fig. 10).

O fator de alongação 1-alfa foi mais abundante nas linhagens sensíveis de ambas as espécies analisadas LbWTS e LcWTS. Ao comparar LcWTS e LbSbR, a proteína enolase e o precursor da proteína ferro-enxofre Reiske foram mais abundantes nestas duas linhagens. A proteína fosfatase foi mais abundante nas linhagens LbWTS e LcSbR. Além disso, três proteínas foram identificadas em *spots* únicos e/ou mais abundantes nas linhagens resistentes de ambas as espécies de *Leishmania* estudadas, a enzima triparedoxina peroxidase, a proteína de citoesqueleto alfa-tubulina e a Hsp60. É interessante notar que *spots* das proteínas HSP83 e HSP70 foram mais abundantes em três linhagens, LcWTS, LcSbR e LbSbR. Em *L. braziliensis*, *spots* das proteínas subunidade beta da ATPase e beta-tubulina foram únicos e/ou mais abundantes em ambas as linhagens LbWTS e LbSbR.

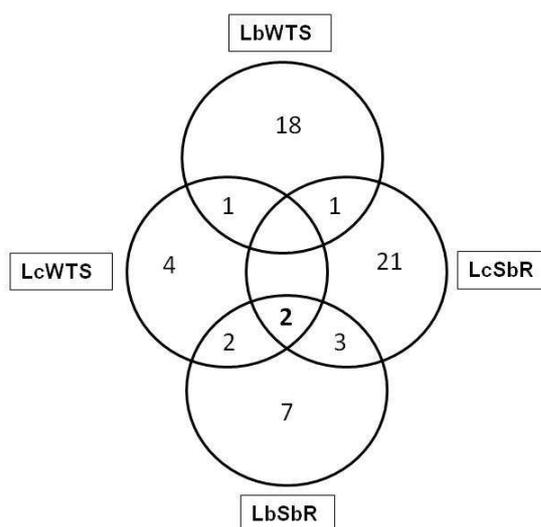


Figura 10- Diagrama de Venn mostrando a análise proteômica comparativa das proteínas identificadas por 2-DE seguida por LC/MS/MS. Na análise proteômica comparativa, 20 e 14 proteínas foram identificadas como únicas e/ou mais abundantes nas linhagens LbWTS e LbSbR, respectivamente. Já para as linhagens LcWTS e LcSbR, foram identificadas 9 e 27 proteínas únicas e/ou mais abundantes. Entre essas proteínas, observou-se que algumas foram comuns entre as linhagens analisadas: LcWTS x LbWTS (fator de alongação 1-alfa), LcWTS x LbSbR (enolase e precursor da proteína ferro-enxofre Reiske), LbWTS x LcSbR (proteína fosfatase), LcSbR x LbSbR (Triparedoxina peroxidase, alfa-tubulina e HSP60), LcSbR x LbSbR x LcWTS (HSP70 e HSP83) e LbWTS x LbSbR (Beta-tubulina e subunidade beta da ATPase - não mostradas no gráfico).

4.4 Análise do nível de expressão das proteínas ciclofilina-A, pteridina redutase e triparedoxina peroxidase em linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* sensíveis e resistentes ao antimonial

Os níveis de expressão de ciclofilina-A (CYPA), pteridina redutase (PTR1) e triparedoxina peroxidase (TRYP) foram avaliados em linhagens de *L. braziliensis* e de *L. infantum* resistentes e sensíveis ao antimonial por *Western blotting* 1-DE e 2-DE utilizando anticorpos específicos.

Ciclofilina-A

A análise proteômica mostrou que o nível de expressão da CYPA foi três vezes reduzido na linhagem LbSbR em comparação com o seu par sensível LbWTS, *spot* 23 (Fig. 5A). Para confirmar esse resultado, o nível de expressão de CYPA foi avaliado por ensaios de *Western blotting* 2-DE, utilizando-se um anticorpo policlonal anticiclofilina-A de *T. cruzi* (TcCYPA). Este anticorpo foi utilizado devido à elevada identidade entre as sequências de aminoácidos da CYPA de *T. cruzi* em comparação com *L. braziliensis* e *L. infantum* (81% e 79%, respectivamente). O resultado de *Western blotting* 2-DE mostrou que o anticorpo anti-TcCYPA reconheceu dois *spots* com o tamanho esperado de 19 kDa e pI 8,0 na linhagem sensível de *L. braziliensis* e um *spot* na linhagem resistente LbSbR. Estes *spots* coincidem com os valores de pI e massa molecular da CYPA, LbrM.25.0790 (Fig. 11A). A análise densitométrica destes *spots* mostrou que a expressão de CYPA foi menor na linhagem LbSbR resistente em relação ao seu par sensível LbWTS, confirmando nossos dados de proteoma.

Quanto à espécie *L. infantum*, o anticorpo anti-TcCYPA reconheceu seis *spots* em LcWTS e cinco *spots* na LcSbR, correspondentes às diferentes isoformas da CYPA, LinJ..25.0940 (Fig. 11B). Os dados mostram que em *L. infantum* a expressão de CYPA também foi menor na linhagem LcSbR em comparação com o seu par sensível LcWTS. Este resultado foi similar ao perfil de *Western blotting* 2-DE de *L. braziliensis*. É importante mencionar que CYPA não foi identificada como diferencialmente abundante na nossa análise proteômica comparativa entre LcWTS e LcSbR, uma vez que *spots* proteicos de baixo peso molecular não foram analisados por estarem no final do gel, uma região de baixa resolução.

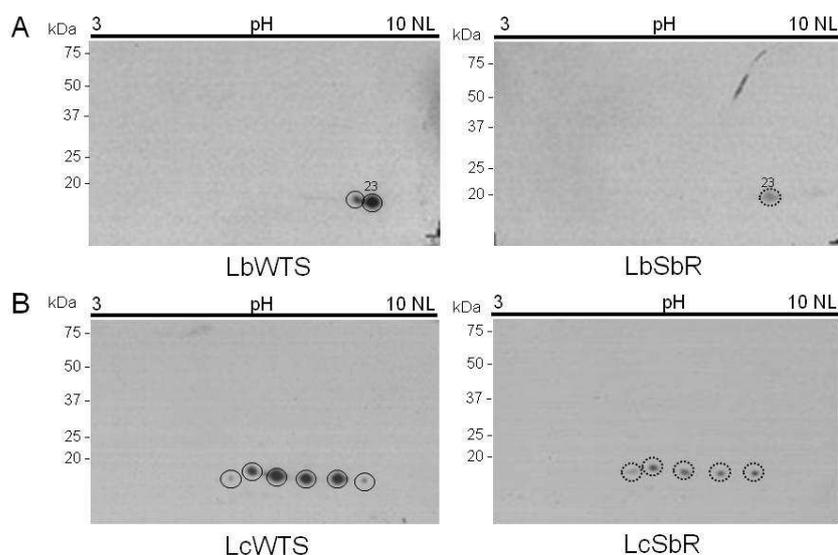


Figura 11- Análise da expressão de CYPA em linhagens *Leishmania* spp. *Western blotting* 2-DE de proteínas totais submetidas à IEF em fitas de IPG com pH 3-10 NL, separadas por eletroforese 15% SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose, incubadas com anticorpo policlonal de coelho anticiclofilina-A de *T. cruzi* (1:1.500) e reveladas usando ECL. Spots proteicos reconhecidos pelo anticorpo nas linhagens de *L. braziliensis* (A) e *L. infantum* (B) apresentando maior expressão estão circulados com linhas cheias e aqueles com menor expressão com linhas pontilhadas.

Em ambas as espécies de *Leishmania* estudadas, a expressão de CYPA é menor nas linhagens resistentes SbR quando comparadas com seus pares sensíveis WTS. Em ensaios de *Western blotting* 1-DE, o anticorpo para TcCYPA reconheceu uma banda de 19kDa em todas as amostras de *Leishmania* estudadas (Fig. 14A). A análise densitométrica da intensidade das bandas de CYPA usando-se a proteína alfa-tubulina como normalizador (Fig.14D) mostrou que o nível de expressão da proteína CYPA foi de 1,7 e 2,5 vezes menor nas linhagens resistentes LcSbR e LbSbR, respectivamente, em comparação com os seus pares sensíveis LcWTS e LbWTS, confirmando nossos dados proteoma.

Pteridina redutase

A análise proteômica comparativa entre as linhagens LbWTS e LbSbR mostrou que pteridina redutase (PTR1), LbrM.23.0300, foi identificada em um *spot* único na amostra de LbSbR, *spot* 14 (Fig. 12A). Para confirmar esse resultado, o *Western blotting* 2-DE foi realizado, utilizando-se um anticorpo policlonal anti-PTR1 de *L. major*. A porcentagem de identidade entre as sequências de aminoácidos PTR1 de *L. major* em comparação com *L. braziliensis* e *L. infantum* foi de 73% e 90%, respectivamente. Os resultados revelaram que este anticorpo reconheceu com grande intensidade um *spot* com cerca de 31kDa, correspondente a PTR1, apenas na linhagem LbSbR, confirmando nossos dados de análise proteômica (Fig. 12B). Na análise proteômica de ambas as linhagens de *L. infantum*, a PTR1 não foi detectada entre as proteínas diferencialmente abundantes identificadas.

Adicionalmente, a análise de *Western blotting* 2-DE mostrou que o anticorpo anti-PTR1 não reconheceu nenhuma proteína nas linhagens LcWTS e LcSbR de *L. infantum* (dados não mostrados). De outro lado, a análise de *Western blotting* 1-DE mostrou que o anticorpo anti-PTR1 reconheceu um polipeptídeo de 31kDa para ambas as espécies de *Leishmania* analisadas. No entanto, o nível de expressão da proteína PTR1 foi similar entre ambas as linhagens, LcWTS e LcSbR de *L. infantum* (Fig. 14B). Já a análise densitométrica desta banda de 31kDa revelou que a PTR1 foi sete vezes mais expressa na linhagem resistente de *L. braziliensis* (LbSbR) em relação ao seu par sensível LbWTS (Fig. 14B).

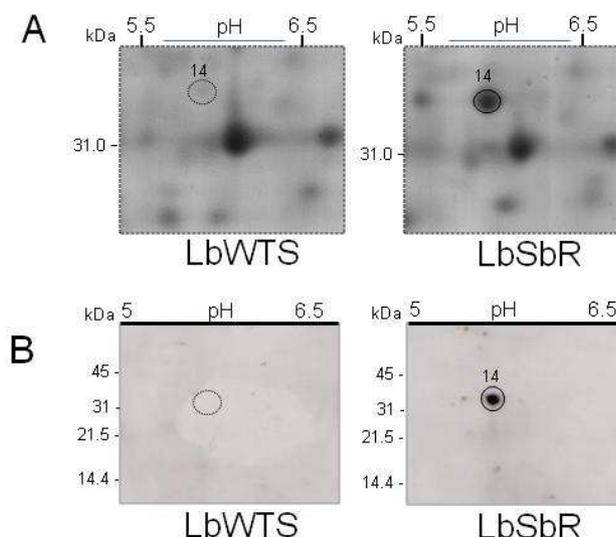


Figura 12- Análise proteômica e *Western blotting* 2-DE de PTR1 nas linhagens LbWTS e LbSbR. (A) Comparação de regiões ampliadas de LbWTS e LbSbR do perfil de proteínas coradas com azul de Coomassie coloidal G-250 (Fig. 5A). Um *spot* único (14) foi identificado como PTR1 por LC/MS/MS e está circulado. (B) As proteínas (20µg) foram submetidas a IEF em fitas IPG (7cm) pH 5-8, separadas por 15% SDS- PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com o anticorpo policlonal de coelho anti-pteridina redutase de *L. major* (1:100) e reveladas usando ECL. Este anticorpo reconheceu um único *spot* somente na linhagem LbSbR.

Triparedoxina peroxidase

Os nossos resultados de análise proteômica mostraram que cinco *spots* proteicos foram identificados como triparedoxina peroxidase (TRYP), LbrM.15.1100, na linhagem LbSbR (Fig. 13A). Na análise de *Western blotting* 2-DE, o anticorpo antitriparedoxina peroxidase citosólica de *T. cruzi* (NOGUEIRA et al., 2009) reconheceu um *spot* na linhagem LbWTS e três *spots* na linhagem LbSbR (Fig. 13B). Dois destes *spots* coincidiram com os *spots* 12 e 10, identificados por MS/MS na linhagem LbSbR. No entanto, este anticorpo reconheceu também um *spot* em cada linhagem, os quais não foram identificados por MS/MS, provavelmente, devido à falta de material. Assim, os dados sugerem que as proteínas reconhecidas por este anticorpo correspondem às isoformas citoplasmáticas de TRYP. É importante considerar que a porcentagem de identidade entre as sequências de aminoácidos da enzima TRYP de *T. cruzi* em comparação com *L. braziliensis* e *L. infantum* correspondem a 69% e 72%, respectivamente.

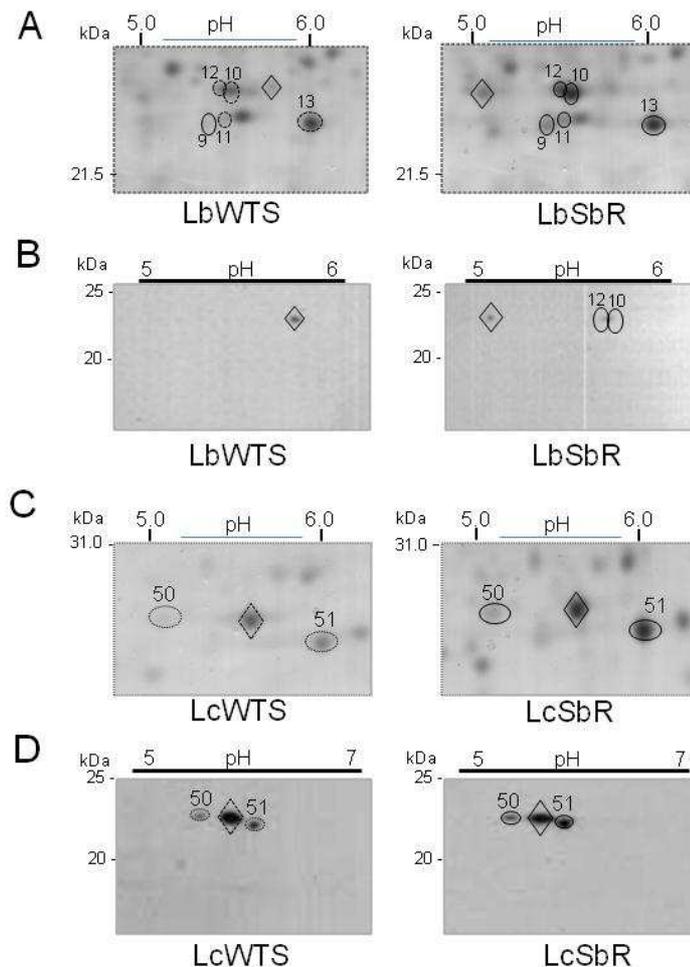


Figura 13- Análise proteômica e Western blot 2-DE da triparedoxina peroxidase em linhagens *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao antimonial. Comparação das regiões amplificadas de perfis de proteínas de linhagens de *Leishmania* SbR e WTS coradas com azul de Coomassie coloidal G-250 (IEF foi realizada IPGs de 17cm, pH 4-7) (Fig. 5). Os spots proteicos únicos e/ou mais abundantes identificados como TRYP por LC/MS/MS nas linhagens de *L. braziliensis* – 5 spots: 9, 10, 11, 12 (A) e de *L. infantum* – 2 spots: 50 and 51 (C) estão circulos e os spots não identificados por MS/MS estão indicados por losângulos. Proteínas (20µg) foram submetidas a IEF em fitas de IPGs (7cm), pH 5-8, separadas em 15% SDS- PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo policlonal de coelho antitriparedoxina peroxidase citosólica de *T. cruzi* (1:1.500), e reveladas utilizando ECL. Este anticorpo reconheceu um e três spots proteicos nas linhagens LbWTS e LbSbR, respectivamente (B), e três spots proteicos em ambas as linhagens de *L. infantum* (D) Os spots proteicos com maior abundância estão circulos e com diminuição da abundância com linhas pontilhadas. Os spots proteicos reconhecidos pelo anticorpo anti-Tryp mas não identificados por LC/MS/MS (B e D) estão indicados por losangos. Os spots proteicos 9, 11 e 13 (A e B) não foram reconhecidos pelo anticorpo anti-Tryp.

Na análise proteômica de *L. infantum*, os spots 50 e 51 foram identificados como TRYP, LinJ.23.0050. Foram mais abundantes na linhagem LcSbR em comparação com seu par sensível LcWTS (Fig. 13C). Na análise de *Western blotting* 2-DE, o anticorpo anti-TcTRYP reconheceu três spots com massa molecular de aproximadamente 20kDa e pI 6.0, que corresponde à triparedoxina peroxidase em ambas as linhagens LcWTS e LcSbR (Fig. 13D). Nessa análise, foram observados dois spots superexpressos na linhagem LcSbR em comparação com o seu par sensível LcWTS (spots 50 e 51) e um spot presente em níveis similares em cada linhagem. Estes resultados confirmam nossa análise proteômica (Fig. 13C). Na análise *Western blotting* 1-DE, o anticorpo anti-

TcTRYP reconheceu uma banda de 20kDa em todas as linhagens de *Leishmania* estudadas (Fig. 14C). A análise densitométrica das bandas correspondente à TRYP mostrou que esta proteína é de 1,6 a 3 vezes mais expressa em ambas as linhagens resistentes (LcSbR e LbSbR) comparada com seus respectivos pares sensíveis (LcWTS e LbWTS), confirmando nossos resultados de proteoma (Fig. 13A e C).

Estudos funcionais da superexpressão de ciclofilina-A, pteridina redutase e triparedoxina peroxidase em *Leishmania* spp. resistente e sensível ao SbIII estão sendo conduzidos para determinar uma possível associação destas proteínas com o fenótipo de resistência destes parasitos ao antimônio.

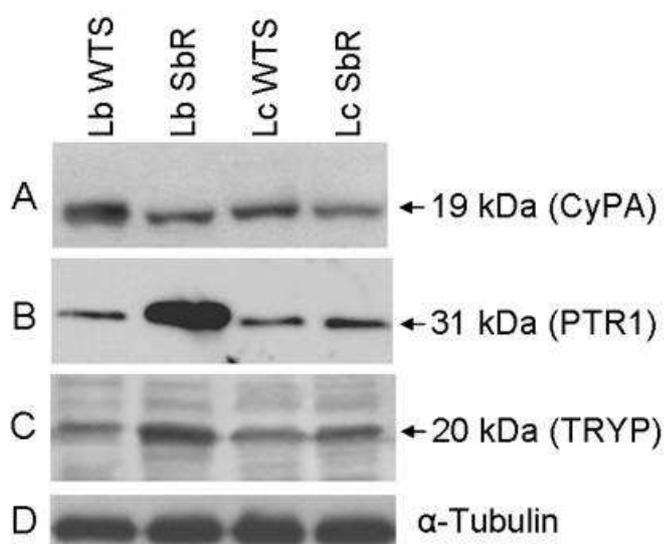


Figura 14- Análise do nível de expressão de ciclofilina-A (CYPA), pteridina redutase (PTR1) e triparedoxina peroxidase (TRYP) em linhagens de *L. braziliensis* (Lb) e de *L. infantum* (Lc) resistentes e sensíveis ao antimonial. Proteínas (20 μ g) foram separadas em 15% SDS-PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com diferentes anticorpos policlonais de coelho: anti-ciclofilina-A de *T. cruzi* (1:1.500) (A), anti-pteridina redutase de *L. major* (1:100) (B) e anti-triparedoxina peroxidase citosólica de *T. cruzi* (1:1.500) (C), e reveladas utilizando ECL. As bandas foram normalizados utilizando o anticorpo monoclonal anti- α -tubulina (1:10.000) (Sigma, St. Louis, EUA) (D). As intensidades das bandas foram analisada utilizando o software ATLAS PB 2.0.

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise comparativa de linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* resistentes e sensíveis ao antimonial

As leishmanioses representam um grave problema de saúde pública em vários países. A quimioterapia é a medida mais importante para o controle das leishmanioses, visto que não existe ainda uma vacina eficiente para uso em humanos (Palatnik-De-Sousa, 2008). Além disso, o controle vetorial é difícil, devido às características ambientais muito diversas, e a existência de um grande número de reservatórios domésticos e silvestres. Os antimoniais pentavalentes, SbV, são os medicamentos de primeira escolha usados no tratamento de todas as formas de leishmaniose na América do Sul, Norte de África, Turquia, Bangladesh e Nepal. Apesar de serem amplamente utilizados no tratamento das leishmanioses por mais de setenta anos, eles apresentam alta toxicidade no tratamento clínico e alguns pacientes são resistentes a estes compostos. Por exemplo, mais de 60% dos pacientes com leishmaniose visceral no estado de Bihar, na Índia, não respondem ao tratamento com antimoniais SbV. Outras drogas têm sido introduzidas como agentes quimioterápicos alternativos, incluindo pentamidina, paromomicina, anfotericina B lipossomal e miltefosina. No entanto, a eficácia de cura destes compostos ainda está sendo avaliada. Em alguns casos, pôde-se verificar o rápido aparecimento de resistência aos novos quimioterápicos. E, ainda, tem sido observado o surgimento de resistência cruzada entre miltefosina e anfotericina B (Vergnes et al., 2007). A descoberta de novas drogas e/ou alvos para quimioterapia é uma necessidade urgente.

Uma vez que a regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos é predominantemente pós-transcricional, abordagens proteômicas têm sido amplamente utilizadas para estudar a expressão diferencial de proteínas em diferentes espécies de *Leishmania* (Cuervo et al., 2010; Mcnicoll et al., 2006; Paape & Aebischer, 2011).

Recentemente, o genoma de várias espécies *Leishmania* (*L. major*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. donovani* e *L. tarentolae*) foi sequenciado, o que impulsionou significativamente o número e a qualidade dos estudos de proteômica. Alguns estudos comparativos do padrão de expressão de proteínas entre parasitos resistentes e sensíveis a drogas utilizando proteômica visaram à compreensão dos mecanismos moleculares da resistência. A resistência induzida ao metotrexato foi investigada em *L. major* por Drummelsmith et al. (2003 e 2004). Posteriormente, análises proteômicas foram realizadas usando linhagens de *L. donovani* sensíveis e resistentes ao arsenito (Sharma et al., 2009) e linhagens de *L. infantum* resistentes a gentamicina (Daneshvar et al., 2012). Em relação ao

antimônio, uma análise proteômica foi realizada utilizando amostras de isolados clínicos de *L. donovani* resistentes ao SbV (Biyani et al., 2011; Kumar et al., 2010; Vergnes et al., 2007).

Vergnes e colaboradores (2007), utilizando amostras de isolados clínicos de *L. donovani* resistentes ao SbV, identificaram várias proteínas diferencialmente expressas. Dentre essas proteínas, os autores observaram que a proteína de choque térmico HSP83 e a calpaína estão envolvidas com a morte celular programada induzida pelo antimônio. A análise proteômica comparativa de amastigotas axênicas de linhagens de *L. infantum* sensíveis e resistentes a SbIII revelou que a expressão da arginino succinato sintetase foi aumentada e que o nível de expressão da proteína de membrana do cinetoplasto (KMP-11) foi reduzido nestes parasitos (El Fadili et al., 2009). A análise proteômica de linhagens de *L. panamensis* resistentes e sensíveis a SbIII revelaram que os parasitos resistentes apresentaram alterações nos níveis de proteínas associadas com as principais vias metabólicas e proteínas envolvidas na resposta geral ao estresse (Walker et al., 2012). Em conjunto, vários estudos de mecanismos de resistência a drogas foram realizados em espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, entretanto os mecanismos envolvidos na resistência ao antimônio em espécies de *Leishmania* do Novo Mundo são ainda pouco conhecidos.

Neste trabalho, foi realizada uma análise proteômica comparativa entre linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* sensíveis e resistentes ao SbIII utilizando-se a metodologia 2-DE, seguida por espectrometria de massa. A imagem dos géis 2-DE mostrou diferença significativa dos perfis proteômicos entre as duas espécies de *Leishmania* analisadas, pertencentes a diferentes subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* (Fig. 4 a 7). O número de *spots* proteicos diferencialmente expressos analisados por par de amostras de *Leishmania* (resistente/sensível) foi 360 *spots* para *L. braziliensis* e 320 para *L. infantum*. Na linhagem LbWTS 66 *spots*, foram únicos ou mais abundantes. Este número foi maior do que aquele encontrado em seu par resistente, LbSbR, que apresentou 53 *spots* únicos e/ou mais abundantes. E, ainda, LcSbR apresentou 60 *spots* únicos e/ou mais abundantes e o seu par sensível apresentou apenas 14 *spots* (Tabela 1). Em todas as amostras de *Leishmania* analisadas, 192 *spots* foram únicos e/ou mais abundantes, sendo que 132 *spots* foram submetidos à análise LC/MS/MS para a identificação de proteínas, uma vez que eles apresentaram perfis bem definidos e reproduzíveis. Entre estes, 80 *spots* proteicos foram identificados correspondendo a 57 proteínas distintas.

Nossos resultados em relação ao número de *spots* identificados estão dentro do esperado, devido às limitações da técnica 2-DE e às dificuldades de se identificar proteínas

pouco abundantes por MS. Proteínas pouco abundantes não são detectadas por coloração convencional. Isso inclui proteínas reguladoras, receptores e outras proteínas que desempenham um papel-chave nos processos celulares. Além dessas, proteínas muito pequenas ou muito grandes, alcalinas e hidrofóbicas, além de proteínas de membranas têm sua detecção limitada (Beranova-Giorgianni, 2003). A quantidade de amostra disponível para análise é ainda mais reduzida, devido às perdas que ocorrem durante a preparação e a digestão dos *spots*. Dados de MS de alguns *spots* proteicos podem conter poucos sinais peptídicos, não sendo suficientes para a identificação da proteína. Ainda assim, a análise 2-DE seguida pela MS é uma importante metodologia para a pesquisa proteômica. A abordagem baseada em 2-DE tem características que são atualmente inigualáveis em relação à outras metodologias utilizadas em proteômica. O conteúdo de informações de uma única amostra geradas por essa abordagem é elevado. Atributos específicos das proteínas analisadas podem ser determinados como: ponto isoelétrico, massa molecular e a quantidade relativa. Várias proteínas podem ser resolvidas e visualizadas simultaneamente em um único gel 2-DE e o perfil proteômico, após padronizações, é muito reprodutível.

A análise proteômica de proteínas de membrana utilizando a metodologia eletroforese bidimensional, infelizmente, não é adequada, em decorrência do processo de extração das proteínas totais dos parasitos. Alguns detergentes interferem na focalização isoelétrica, dificultando a correta migração das proteínas na fita de pH (*strips*). Diante disso, no tampão de lise, não podem ser utilizadas altas concentrações de determinados detergentes. Neste estudo, utilizou-se tampão de lise contendo, entre outros reagentes, 4% de CHAPS, que permite a extração de proteínas totais dos parasitos, mas a maioria das proteínas do extrato é composta por proteínas solúveis. Para o enriquecimento de proteínas de membranas, seria necessário utilizar outras abordagens. Por esta razão, este estudo carece de dados sobre tais proteínas. Kumar e colaboradores (2010) analisaram perfis de proteoma de frações enriquecidas de proteínas de membranas de amostras de *L. donovani* resistentes ao SbV. Eles constataram a superexpressão do transportador ABC (ATP-binding cassette). Esses transportadores são proteínas transmembranas que utilizam a energia resultante da hidrólise de ATP para transportar uma variedade de moléculas através de membranas biológicas, incluindo drogas quimioterapêuticas. Alguns membros dessa superfamília ABC estão associados com resistência a drogas pela superexpressão de proteínas de resistência a múltiplas drogas (multidrug resistance associated protein – MRP) (Borst & Ouellette, 1995). Além desse transportador, os autores observaram nesses parasitos resistentes maior expressão das proteínas HSP83, proteína rica em cisteína-leucina e transamidase proteica GPI.

A análise comparativa dos dados indicados na Tabela 2 mostra que as proteínas envolvidas na defesa antioxidante foram identificadas como únicas e/ou mais abundantes na linhagem resistente LbSbR. Sete *spots* foram identificados como proteínas envolvidas nesse processo. Cinco foram identificados como proteínas do citoesqueleto nessa linhagem. Foram encontradas também três proteínas relacionadas com a resposta ao estresse e o mesmo número de proteínas envolvidas no metabolismo. Na linhagem LcSbR, onze proteínas metabólicas foram encontradas, cinco proteínas de choque térmico, três proteínas de citoesqueleto, duas proteínas envolvidas na defesa antioxidante e processamento de RNA/DNA, e uma proteína envolvida na biossíntese de proteínas. Na linhagem LcSbR, oito *spots* foram identificados como proteínas anotadas como hipotéticas. Neste estudo, observou-se que entre as 57 proteínas distintas, identificadas por análise proteômica, 17 foram também identificadas anteriormente (Tab. 3 e 4) (Biyani et al., 2011; EL Fadili et al., 2009; Kumar et al., 2010; Vergnes et al., 2007; Walker et al., 2012) e as outras 40 foram observadas apenas em nossa análise proteômica de linhagens de *Leishmania* spp. sensíveis e resistente ao SbIII. Acreditamos que algumas dessas proteínas estejam associadas com a resposta geral ao estresse e outras podem estar associadas ao mecanismo de resistência ao antimônio em *Leishmania* spp. Provavelmente, as alterações fisiológicas de parasitos resistentes podem modificar as vias metabólicas para a elaboração de um fenótipo de resistência.

5.2 Proteínas de choque térmico, chaperonas moleculares e proteínas que respondem ao estresse

Proteínas de choque térmico representam uma superfamília de proteínas que têm a função de proteger a célula contra o estímulo externo que causa dano celular. Em células cancerosas humanas, tem sido descrita uma associação de resistência a drogas com a indução da expressão de proteínas de estresse (Wallner et al., 1986). Em amostras de *Leishmania* spp. resistentes ao arsenito, foi demonstrada a superexpressão de proteínas de choque térmico de diferentes massas moleculares (Lawrence & Robert-Gero, 1985). As proteínas HSP70 e HSP83 são muito conservadas evolutivamente e estão associadas com estresse químico e físico. Além disso, elas também desempenham papel vital no funcionamento normal das células. As HSP83s, por exemplo, executam funções de manutenção, controle da atividade, volume e de tráfico de uma variedade de proteínas (Adriano et al., 2007; Folgueira & Requena, 2007; Larreta et al., 2004; Pinelli & Shapira, 1990; Shapira, 1989). Neste estudo, observamos superexpressão das proteínas HSP70 e HSP83 em ambas as linhagens resistentes LbSbR e LcSbR (Tabelas 3 e 4). Na linhagem LcSbR, uma HSP70 mitocondrial (LINJ.30.2530) e outra citoplasmáticas foram, aproximadamente, duas e três vezes mais

abundantes em comparação com a linhagem sensível LcWTS. Em *L. braziliensis*, um *spot* proteico identificado como HSP70 foi duas vezes mais abundante na linhagem resistente LbSbR em comparação com a linhagem sensível LbWTS. Em relação à HSP83, os resultados mostraram que dois *spots* proteicos identificados para esta proteína também foram 2,4 e 2,6 vezes mais abundantes nas linhagens LbSbR e LcSbR, respectivamente, do que nos seus pares sensíveis.

Dados da literatura mostram que as HSPs estão mais expressas em amostras de *Leishmania* spp. resistentes a drogas. A superexpressão de variantes de proteínas de choque térmico de diferentes massas moleculares tem sido observada na resistência ao arsenito (Lawrence & Robert-Gero, 1985) e ao antimônio (Biyani et al., 2011; do Monte-Neto et al., 2011; Kumar et al., 2010; Vergnes et al., 2007; Walker et al., 2012). Conforme descrito na literatura, a HSP83 participa da ativação da morte celular programada mediada por drogas, interferindo no potencial de membrana mitocondrial de *L. donovani* (Kumar et al., 2010; Vergnes et al., 2007). Os dados sugerem que a HSP70 desempenha um papel secundário na resistência ao antimônio, sendo uma primeira resposta inespecífica do parasito ao estresse. No entanto, esta resposta é fundamental para permitir que as células possam desenvolver mecanismos mais específicos e eficientes de resistência a drogas (Brochu et al., 2004; Drummelsmith et al., 2004; Kumar et al., 2010; Walker et al., 2012).

Os genes que codificam a HSP70 e a HSP83 constituem famílias multigênicas que apresentam diferenças e/ou pequenas variações na sequência, ocasionando, portanto, diferenças no ponto isoelétrico e na massa molecular (da Silva, 2008; Fraga et al., 2010). Em *L. infantum*, por exemplo, as proteínas HSP83 e HSP70 foram superexpressas nas linhagens LcWTS e LcSbR (Fig. 10). Estes resultados podem ser atribuídos às alterações no ponto isoelétrico e no peso molecular, devido a modificações pós-traducionais nessas proteínas. Dependendo do estresse produzido pela droga, uma proteína pode sofrer alguma modificação, propiciando assim uma diferença na abundância de algumas isoformas da mesma proteína. Estes resultados foram também observados por outros autores. As proteínas calmodulina e HSP70 foram superexpressas em ambos os isolados de *L. donovani* sensíveis e resistente ao SbV (Biyani et al., 2011), assim como o precursor mitocondrial da HSP70 (Vergnes et al., 2007).

Outra proteína de choque térmico, o precursor mitocondrial da chaperonina HSP60, foi 2,5 e 2,8 vezes mais abundante nas linhagens LcSbR e LbSbR, respectivamente. A HSP60 responde ao choque térmico e é encontrada principalmente em mitocôndrias e cloroplastos

(Bukau & Horwich, 1998; Hartl, 1996). O *spot* correspondente à proteína induzida por stress ST11, uma cochaperona produzida em resposta ao estresse, que forma um complexo com as proteínas de choque térmico HSP70 e HSP83, foi seis vezes menos abundante na linhagem LcSbR. Neste estudo, foi também observado que *spots* correspondentes à proteína GRP-78, proteína regulada por glicose (Glucose-regulated protein 78), membro da família da HSP70, e à ciclofilina-A, uma chaperona molecular, foram 7,8 e 3,5 vezes menos abundantes na linhagem LbSbR, respectivamente.

A ciclofilina-A desempenha importantes funções biológicas de transdução de sinal, interação proteína-proteína, resposta a estresse e enovelamento proteico. Tem atividade peptidil-prolil isomerase cis/trans (PPIase) que acelera o enovelamento de proteínas, o tráfico de proteína, a modulação imunitária e a transdução de sinal (Obchoei et al., 2009). Além disso, é considerada a principal proteína receptora intracelular de droga imunossupressora (Rovira et al., 2000). Dutta e colaboradores (2001) observaram aumento de expressão da ciclofilina em *L. donovani* na presença da droga imunossupressora ciclosporina (CsA). A estrutura cristalográfica da ciclofilina-A e sua interação com CsA têm sido estudada em *L. donovani* e outros organismos (Banerjee et al., 2002; Galat & Bua, 2010; Venugopal et al., 2007; Yau et al., 2010). Em *L. braziliensis*, tem sido relatado que a ciclofilina-A é secretada/liberada através de uma via de secreção não convencional, na ausência de peptídeo sinal (Cuervo et al., 2009). Em eucariotos superiores, foi proposto um mecanismo de transporte vesicular complexo para a secreção desta proteína (Suzuki et al., 2006).

Na análise proteômica comparativa, o nível de expressão da CYPA foi 3,5 vezes reduzido na linhagem LbSbR em comparação com o seu par sensível, LbWTS. O resultado de *Western blotting* 2-DE mostrou que o anticorpo anti-TcCyPA reconheceu dois *spots* com o tamanho esperado na linhagem sensível de *L. braziliensis* e um *spot* na linhagem resistente LbSbR. Esses *spots* coincidem com os valores de pI e massa molecular da CYPA, LbrM.25.0790. Em *L. infantum*, o anticorpo anti-TcCyPA reconheceu seis *spots* em LcWTS e cinco *spots* na LcSbR, correspondentes às diferentes isoformas da CYPA, LinJ..25.0940, com pIs variando de 6,0 a 8,0, provavelmente, devido a modificações pós-translacionais da proteína (Fig. 11B). De acordo com dados da literatura, a ciclofilina-A da *L. infantum* tem um sítio de acetilação, o que pode justificar isoformas dessa proteína com pI mais ácido (Rosenzweig et al., 2008). Os dados mostram que em ambas as espécies analisadas a expressão de CYPA foi menor na linhagem resistente em comparação com o seu par sensível WTS. Esses resultados foram comprovados por *Western blotting* 1-DE usando as linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Vale ressaltar que a ciclofilina ainda não havia sido observada como diferencialmente expressa em análise proteômica comparativa de parasitos resistentes a drogas. Portanto, a análise funcional dessa proteína será muito importante para avaliar seu papel no fenótipo de resistência de *Leishmania* ao antimonial.

5.3 Proteínas do citoesqueleto

Os nossos dados mostraram que três *spots* proteicos detectáveis apenas na linhagem LbSbR foram identificados como proteínas do citoesqueleto, sendo duas alfa e uma beta-tubulina. Outros dois *spots* identificados como sendo estas mesmas proteínas foram duas vezes mais abundantes na linhagem LbSbR. Na linhagem resistente de *L. infantum*, dois *spots* proteicos, um correspondente a uma variante de alfa-tubulina e outro a uma actina, foram únicos e/ou mais abundantes em comparação com a linhagem sensível. Corroborando com nossos resultados, dados da literatura mostraram que as tubulinas também foram mais abundantes em amostras de *L. donovani* resistentes ao arsenito (Jayanarayan & Dey, 2002). Estes autores também relataram mudanças nos níveis de expressão, na dinâmica de polimerização e na regulação da distribuição das tubulinas, bem como a indução da apoptose como parte da resposta de *L. donovani* ao arsenito (Jayanarayan & Dey, 2004). O aumento na expressão das tubulinas foi também observado em isolados clínicos de *L. donovani* resistentes ao antimônio pentavalente (Biyani et al., 2011; Kumar et al., 2010), em amastigotas axênicas de *L. infantum* resistentes ao antimônio trivalente (El Fadili et al., 2009), em *L. major* resistente ao metotrexato (Drummelsmith et al., 2003), em *L. infantum* resistente à gentamicina (Daneshvar et al., 2012) e em *L. panamensis* resistente ao antimonial trivalente (Walker et al., 2012).

Neste estudo, também observamos que *spots* proteicos identificados como beta-tubulinas e como a proteína paraflagelar rod 1D foram encontrados respectivamente, 3,7 e 4 vezes menos abundantes na linhagem LbSbR do que no seu par sensível. De outro lado, um *spot* identificado como proteína actina-like foi único na linhagem LbSbR.

Tubulinas ou fragmentos de tubulinas são comuns em análises proteômicas, devido a sua distribuição e abundância, uma vez que representam 10% do conteúdo total de proteína em *Leishmania*. Elas sofrem com frequência modificações pós-traducionais, como poliglutamilação, poliglicilação, acetilação e fosforilação (Drummelsmith et al., 2003; Jayanarayan & Dey, 2004). Portanto, a aquisição de resistência ao antimônio pode afetar a regulação transcricional ou pós-transcricional destas proteínas do citoesqueleto do parasito (Jayanarayan & Dey, 2002, 2004; Ramírez & Guevara, 1997). Além disso, aumento da

fosforilação de alfa e beta-tubulina foi observado em mutantes de *L. donovani* resistente ao arsenito (Prasad et al., 2000). A fosforilação de tubulinas pode afetar diretamente a dinâmica de montagem de microtúbulos, podendo regular várias vias de transdução de sinal (Gundersen & Cook, 1999). Estes resultados sugerem que tubulinas desempenham um papel crítico na fisiologia/morfologia dos parasitos resistentes a drogas (Kumar et al., 2010; Natera et al., 2007).

5.4 Proteínas da defesa antioxidante e de desintoxicação

Os nossos resultados mostraram que um *spot* único na linhagem LbSbR foi identificado como pteridina redutase (PTR1) (LbrM.23.0300) (Tabela 2). Esta enzima é uma redutase dependente de NADPH, que participa da via de salvação de pterinas, convertendo biopterina em tetrahidrobiopterina, que são componentes essenciais ao crescimento de *Leishmania* (Nare et al., 1997; Nare et al., 2009). Um estudo utilizando linhagens de *L. major* mostrou que esta enzima contribui para a defesa contra o estresse oxidativo dentro dos macrófagos, sugerindo que o mecanismo de ação dos antimoniais pode estar relacionado com a produção de espécies reativas de oxigênio (Nare et al., 2009). A superexpressão de PTR1 foi também observada em linhagens de *L. major* resistentes ao metotrexato (Drummel-Smith et al., 2003).

Nossos resultados de *Western blotting* 2-DE mostraram que o anticorpo reconheceu com grande intensidade um *spot* correspondente à PTR1 apenas na linhagem LbSbR, confirmando nossos dados de análise proteômica (Fig. 12). A análise de Western 1-DE mostrou que o anticorpo anti-PTR1 reconheceu uma banda de 31 kDa para ambas as espécies de *Leishmania* analisadas, sendo que o nível de expressão da proteína PTR1 foi similar entre as linhagens *L. infantum*. Para *L. braziliensis*, a análise densitométrica revelou que a PTR1 foi sete vezes mais abundante na linhagem LbSbR em relação ao seu par sensível, LbWTS (Fig. 14B). Esses resultados sugerem que as espécies de *Leishmania* analisadas neste estudo apresentam diferentes mecanismos de resistência ao antimonial, envolvendo ou não a PTR1. Entretanto, é preciso levar em consideração que existem diferenças no coeficiente de resistência ao SbIII entre ambas as espécies. LbSbR é vinte vezes mais resistente ao antimonial e a linhagem LcSbR é apenas quatro vezes mais resistente. Além disso, neste estudo analisamos apenas uma cepa de cada espécie de *Leishmania* (Liarte e Murta, 2010).

tripanosomatídeos apresentam um mecanismo único para a desintoxicação de peróxidos que é dependente de tripanotona, num processo distinto do encontrado nos vertebrados. Portanto, a defesa antioxidante é um alvo promissor para a quimioterapia de

doenças causadas por esses e outros tripanosomatídeos. A triparedoxina peroxidase (TRYP), um membro da família das peroxiredoxinas, atua na defesa antioxidante e participa de uma cascata enzimática para a desintoxicação de hidroperóxidos (Turrens, 2004). Esta enzima é essencial para a sobrevivência da *Leishmania* durante o estresse oxidativo gerado pelo macrófago e o estresse gerado por droga (Drummel-Smith et al., 2003).

Em nosso estudo, quatro *spots* proteicos correspondentes à triparedoxina peroxidase foram de duas a cinco vezes mais abundantes na linhagem LbSbR do que no seu par sensível, LbWTS (Tabela 3). Além destes, um *spot* exclusivo foi identificado como TRYP nesta linhagem. Estes *spots* podem representar diferentes variantes da triparedoxina peroxidase, devido a modificações pós-traducionais uma vez que foram encontradas diferenças entre os pI calculados e experimentais dos *spots* identificados. Em *L. infantum*, dois *spots* proteicos correspondentes à peroxiredoxina foram 2,5 e 3,5 vezes mais abundantes na linhagem LcSbR do que na linhagem sensível, LcWTS (Tabela 4). A análise da sequência de aminoácidos revelou que ambos os *spots* foram similares à triparedoxina peroxidase de *L. infantum* (LinJ..23.0050). É importante salientar que níveis elevados de triparedoxina e de triparedoxina peroxidase também foram observados em linhagens de *L. donovani* resistentes ao antimônio (Wyllie et al., 2010) e amostras de *L. infantum* resistentes à gentamicina (Daneshvar et al., 2012), corroborando os nossos achados. Estes resultados sugerem que um aumento no metabolismo de peróxidos e na expressão de enzimas da defesa antioxidante pode desempenhar um papel significativo na resistência dos parasitos aos antimoniais.

Ensaio de *Western blotting* 1-DE e 2-DE utilizando anticorpo contra triparedoxina peroxidase citosólica de *T. cruzi* (Nogueira et al., 2009) revelaram maior expressão de TRYP em ambas as amostras resistentes de *L. braziliensis* e *L. infantum*, confirmando os dados de proteoma. A análise funcional da triparedoxina peroxidase será realizada para investigar um possível envolvimento desta enzima no fenótipo de resistência de *Leishmania* aos antimoniais.

5.5 Processamento de RNA/DNA e biossíntese de proteínas

Neste estudo, um *spot* correspondente ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (LbrM.15.1440), que participa dos processos de replicação e reparo do DNA, foi 2,7 vezes mais abundante na linhagem LbSbR. Dados da literatura corroboram com nossos achados, uma vez que esta proteína foi também encontrada aumentada em isolados clínicos de *L. donovani* resistentes ao antimônio pentavalente, sugerindo que ela desempenha um papel no mecanismo de resistência a drogas (Kumar et al., 2010). Alguns *spots* correspondentes a

proteínas ribossomais e a proteínas envolvidas na maquinaria de tradução foram identificados, como o fator de alongação 2 (LinJ.36.0200), que foi 2,6 vezes mais abundante na linhagem LcSbR. É interessante notar que o fator de alongação 2 foi também superexpresso em isolados de *L. donovani* resistentes ao SbV (Biyani et al., 2011) e em linhagens de *L. panamensis* resistentes ao SbIII (Walker et al., 2012).

Além disso, o *spot* proteico correspondente ao fator de alongação 1-alfa foi duas vezes reduzido em ambas as linhagens resistentes de *Leishmania* spp. analisadas. Esta proteína tem sido também implicada em outros processos celulares, tais como a transdução de sinal e apoptose (Lamberti et al., 2004). Também identificamos *spots* proteicos únicos na linhagem LbSbR correspondente à seril-tRNA sintetase (LbrM.19.0220) e à *small ubiquitin protein* (LbrM.08.0500). Algumas proteínas ubiquitina e ubiquitina-like, de aproximadamente 12kDa, apresentam o motivo SUMO (*small ubiquitin-related modifier*). Modificações de proteínas induzidas por SUMO têm sido consideradas na regulação de numerosos processos biológicos, incluindo a transcrição, a localização de proteína e o controle do ciclo celular (García-Estrada et al., 2003; Mukhopadhyay & Dasso, 2007; Ponder & Bogyo, 2007). Além destas proteínas, um *spot* correspondente à subunidade do complexo de associação ao polipeptídeo nascente, cópia 1 (LbrM.04.0750), foi duas vezes menos abundante na linhagem LbSbR em comparação com a linhagem sensível, LbWTS.

Biyani e colaboradores, 2011, observaram várias proteínas envolvidas no processamento de RNA e tradução mais abundantes em isolados clínicos de *L. donovani* resistentes ao antimonial. Dentre elas, citam-se a RNA helicase dependente de ATP, fator de alongação 1- alfa, fator de alongação 2 e subunidade do complexo de associação ao polipeptídeo nascente, cópia 2.

5.6 Enzimas metabólicas

Estudos sobre o mecanismo de ação do antimônio pentavalente (SbV) sugerem que o antimônio inibe a biossíntese de macromoléculas, possivelmente, por meio da perturbação do metabolismo energético, glicólise e oxidação de ácidos graxos (Ouellette et al., 2004). As formas promastigotas de *Leishmania* dependem principalmente do metabolismo de glicólise e de aminoácidos para a geração de energia.

Neste estudo, *spots* proteicos correspondentes às enzimas da via glicolítica, do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e da fosforilação oxidativa foram observados diferencialmente abundantes em ambas as linhagens resistentes das espécies de *Leishmania* spp. analisadas.

Um *spot* proteico único em LcSbR foi identificado como subunidade beta da piruvato desidrogenase E1 (LinJ.25.1790). A enolase está envolvida na glicólise e na gluconeogênese, processos metabólicos essenciais para *Leishmania* spp. (Cuervo et al., 2009; Kumar et al., 2010). Um *spot* proteico correspondente a esta enzima foi observado com redução de 3,1 vezes na linhagem LcSbR e foi observado aumentado duas vezes na linhagem LbSbR em comparação com os respectivos pares sensíveis. A enolase também foi diferencialmente expressa em isolados de *L. donovani* resistentes ao SbV (Kumar et al., 2010; Vergnes et al., 2007). Esta enzima foi encontrada no secretoma/exossoma de *L. donovani* (Silverman et al., 2008), *L. major* (Silverman et al., 2010) e *L. braziliensis* (Cuervo et al., 2009). Ela é inicialmente secretada e, subsequentemente, recuperada pela superfície externa da célula de uma forma ainda desconhecida (Avilán et al., 2011).

Um *spot* correspondente ao precursor da proteína ferro-enxofre Reiske, envolvido no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, foi duas vezes mais abundante na linhagem LbSbR. De outro lado, um *spot* correspondente a esta proteína foi único na linhagem LcWTS. *Spots* correspondentes à enzima isocitrato desidrogenase (LinJ..33.2680) do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e à pirofosfatase inorgânica (LinJ..03.0890) da fosforilação oxidativa foram únicos na linhagem LcSbR em comparação com o seu par sensível.

A análise comparativa quantitativa do proteoma de isolados clínicos de *L. donovani* sensíveis e resistentes ao antimônio pentavalente também revelou aumento significativo na expressão de várias enzimas glicolíticas (Biyani et al., 2011), corroborando nossos dados. Estes dados sugerem que a regulação destas enzimas em parasitos resistentes ao antimônio favorece o aumento da glicólise, fornecendo energia para a sua proliferação. Além disso, a elevada taxa de glicólise ajuda a reduzir o estresse oxidativo, pela produção de piruvato, que é um redutor de peróxidos (Biyani et al., 2011).

Algumas proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e na proteólise apresentaram *spots* com abundância diferencial nas linhagens de *Leishmania* resistentes estudadas. Observou-se que *spots* proteicos correspondentes à aminoacilase e à nitrilase foram detectáveis apenas na linhagem LbWTS. Além disso, *spots* proteicos correspondentes à proteína glutamina sintetase e à catepsina-L foram, aproximadamente, 2,7 vezes menos abundantes na linhagem LbSbR do que no seu par LbWTS. Além disso, observou-se que *spots* proteicos correspondentes à aminopeptidase P1 e aldolase ácido 2,4-di-hidroxi-2-eno-1,7-diólico, foram duas e três vezes mais abundantes na linhagem LcSbR em comparação com o seu par LcWTS. Dados da literatura mostram que a proteína da família aminopeptidase

também foi mais abundante em isolados de *L. donovani* resistentes ao SbV (Biyani et al., 2011).

Em *L. infantum*, observamos que o *spot* proteico correspondente à S-adenosilmetionina sintetase (SAMS) (LINJ.30.3560) foi somente detectado na linhagem LcSbR em comparação com seu par LcWTS. A enzima SAMS desempenha papel central na síntese e montagem de precursores de tripanotona e parece estar envolvida no processo de desintoxicação celular. A SAMS também foi mais abundante em linhagens de *L. panamensis* resistentes ao antimônio trivalente (SbIII) (Walker et al., 2012), corroborando os nossos dados. Como descrito na literatura, a superexpressão das enzimas envolvidas na manutenção dos níveis de tiol sugere um possível envolvimento destas enzimas em resposta à exposição ao fármaco (do Monte-Neto et al., 2011; Walker et al., 2012).

A regulação destas proteínas pode desempenhar papel importante na sobrevivência do parasito. Estes resultados sugerem que a pressão contínua da droga induz uma adaptação metabólica que permite ao parasito selecionar precursores metabólicos para compensar os efeitos primários produzidos por essa pressão, o que pode significar mudanças nessas vias metabólicas (Biyani et al., 2011; Natera et al., 2007; Walker et al., 2012).

5.7 Proteínas hipotéticas, localização genômica, análise de sítio e predição funcional.

Nesta análise, 12 *spots* proteicos que apresentaram abundância diferencial foram identificados como proteínas hipotéticas, sendo oito em LcSbR e quatro em LbWT. Entre estes, três *spots* correspondentes a proteínas hipotéticas foram encontrados como únicos em cada linhagem. Dentre os *spots* identificados como mais abundantes na linhagem LcSbR, foi observado que um *spot* corresponde a uma proteína hipotética, contendo domínios estruturais conservados em HSP23 (LinJ.35.4540), uma cochaperona da HSP90. Nesta mesma linhagem, outro *spot* foi identificado como uma chaperonina rica em arginina, LinJ.35.1220, que degrada proteínas maldobradas (*degradation arginine-rich protein for mis-folding* – Armet). Armet é uma proteína solúvel residente no retículo endoplasmático (ER), induzida pelo estresse. Parece estar envolvida no controle de qualidade no retículo endoplasmático rugoso (Mizobuchi et al., 2007). Além destas, foi observada uma proteína hipotética que tem um domínio Alba (LinJ.34.2410), envolvida no metabolismo de RNA (Aravind et al., 2003; Mani et al., 2011). Corroborando os nossos resultados, esta proteína também teve sua expressão aumentada em *L. infantum* resistente à gentamicina (Daneshvar et al., 2012). Um dos *spots* proteicos somente detectável na linhagem LcSbR foi identificado como a proteína hipotética que possui um domínio AMMECR1 (LinJ.32.0660). O elevado nível de conservação deste

domínio indica que ela desempenha uma função celular básica, possivelmente, na transcrição, replicação, reparo ou na maquinaria de tradução. Um *spot* proteico 2,8 vezes mais abundante na linhagem LcSbR foi identificado como uma proteína hipotética, com domínio fosfodiesterase, GMP-PDE (LinJ.27.1920). Outras proteínas hipotéticas com função desconhecida também foram identificadas neste estudo (Tabelas 3 e 4).

5.8 Relação entre as proteínas com abundância diferencial nas linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* resistentes ao antimonial SbIII e as proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência descritos.

Neste trabalho, outras proteínas que não as descritas foram observadas como únicas e/ou mais abundantes nas linhagens estudadas (Tabelas 3 e 4). Muitas proteínas ainda não foram associadas à resistência ao antimonial e mais estudos são necessários para se comprovar ou excluir o envolvimento delas nesse fenótipo de resistência de *Leishmania*. É possível que algumas dessas proteínas apenas compensem as modificações metabólicas provocadas pela resistência. A aquisição de resistência ao antimônio corresponde a uma resposta ao aumento do estresse oxidativo no citoplasma do parasito. Consistentes com esta hipótese, neste estudo, muitas proteínas selecionadas como diferencialmente expressas nas populações resistentes estão envolvidas na resposta ao aumento do estresse oxidativo, na reciclagem (*turnover*) e no processamento de proteínas necessárias à degradação de proteínas danificadas, como chaperonas e proteases, e diversas enzimas do metabolismo de aminoácidos.

Neste estudo, observamos que linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* resistentes ao antimonial SbIII superexpressam proteínas de choque térmico, cuja função é proteger as células contra o estresse induzido por drogas. Além destas, as proteínas do citoesqueleto e as proteínas envolvidas em diversos processos oxidativos e no metabolismo de carboidratos e de aminoácidos foram também diferencialmente expressas nestas linhagens. Observamos, ainda o aumento na expressão de enzimas envolvidas na defesa antioxidante, sendo esta, possivelmente, uma característica chave dos mecanismos de resistência ao antimônio. Além disso, uma alta taxa de glicólise reduz o estresse oxidativo, uma vez que o piruvato, produto da glicólise, é um redutor de peróxidos. Provavelmente, as alterações fisiológicas dos parasitos resistentes modificam o fluxo de várias vias para compensar o fenótipo de resistência a drogas. Ponte-Sucre (2003) demonstrou que o fenótipo de resistência a drogas também está associado com mudanças em eventos fisiológicos, tais como: infectividade do parasito, incorporação de metabolitos, xenobióticos e conjugação de tráfego, metabolismo intracelular e morfologia celular. O aumento da abundância de enzimas envolvidas na defesa

antioxidante é, possivelmente, uma característica fundamental dos mecanismos de resistência ao antimônio. Além disso, uma alta taxa de glicólise reduz o estresse oxidativo. De outro lado, as proteínas de estresse, tais como a ciclofilina-A, a proteína regulada por glicose (GRP-78) e as enzimas do metabolismo dos aminoácidos (aminocilase, nitrilase, glutamina sintetase e catepsina), foram menos abundantes na linhagem resistente LbSbR.

A abordagem proteômica tem sido utilizada por vários autores para a compreensão de mecanismos de resistência de *Leishmania* spp. aos antimoniais. Vários estudos revelaram que a resistência ao antimônio está associada com a superexpressão de proteínas envolvidas em diversos processos, incluindo metabolismo, organização do citoesqueleto, resposta ao estresse geral, processamento de RNA/DNA e sobrevivência intracelular (Biyani et al., 2011; Kumar et al., 2010; Vergnes et al., 2007; Walker et al., 2012). Em nosso estudo, observamos que 17 proteínas, identificadas como únicas e/ou mais abundantes em linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* sensíveis e resistentes ao SbIII, foram também identificadas em isolados de *L. donovani* resistentes ao SbV (Biyani et al., 2011; Kumar et al., 2010; Vergnes et al., 2007) e/ou linhagens de *L. panamensis* resistentes ao SbIII (Walker et al., 2012). Dentre essas proteínas, podem-se citar: HSP83, HSP70, alfa e beta tubulinas, enolase, fator de alongação 2, fator de alongação 1-alfa, aminopeptidase, antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), subunidade do complexo de associação ao polipeptídeo nascente, RNA helicase ATP dependente, carboxipeptidase, proteína de ligação a GTP (Rab7), proteína de estresse induzido (STI-1), subunidade beta da ATPase e S-adenosil-metionina-sintetase. Por outro lado, 40 proteínas foram observadas apenas em nossa análise proteômica de linhagens de *Leishmania* spp. sensíveis e resistente ao SbIII. Acreditamos que algumas dessas proteínas estão associados com a resposta geral ao estresse e outros podem estar associadas a mecanismos de resistência ao antimônio em *Leishmania* spp. Estudos funcionais são necessários para investigar melhor o papel dessas proteínas.

As análises de *Western blotting* 1-DE e 2-DE de algumas proteínas confirmaram os dados de proteoma. Os resultados mostraram que ciclofilina-A é menos expressa em ambas as linhagens resistentes LbSbR e LcSbR. De outro lado, a pteridina redutase é mais abundante na linhagem LbSbR e a triparedoxina peroxidase é mais abundante em ambas as linhagens resistentes LbSbR e LcSbR. Juntos, estes resultados mostram que o mecanismo de resistência de *Leishmania* spp. ao antimônio é complexo e multifatorial. Várias proteínas identificadas como diferencialmente expressas neste estudo foram previamente descritas como potenciais alvos terapêuticos. Outras foram descritas com participação, direta ou indireta, em mecanismos de resistência a drogas (Fig.15). Acreditamos que um melhor entendimento sobre

as proteínas diferencialmente expressas nas linhagens de *Leishmania* spp. resistentes ao antimônio, apresentadas neste estudo, pode auxiliar o conhecimento do fenótipo de resistência a drogas e do metabolismo destes parasitos, dessa forma, contribuindo para o desenvolvimento de novos alvos para a quimioterapia das leishmanioses.

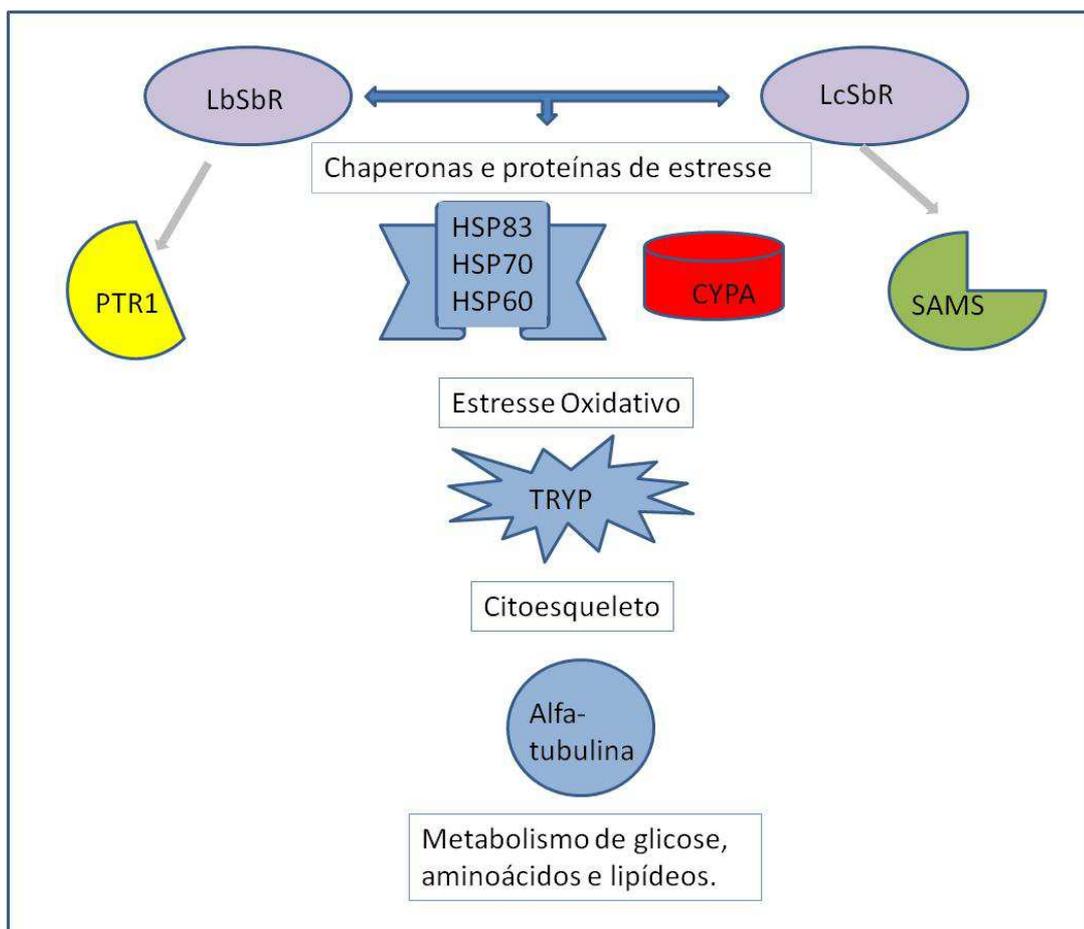


Figura 15- Proteínas com abundância diferencial nas linhagens resistentes LbSbR e LcSbR. Principais categorias de proteínas com abundância diferencial nas espécies estudadas. Em azul, proteínas que foram mais abundantes em ambas as linhagens resistentes, TRYP, alfa-tubulina, HSP83, HSP70 e HSP60. Em amarelo, proteína mais abundante na linhagem LbSbR, PTR1. Em verde, proteína mais abundante na linhagem LcSbR, SAMS. Há evidências de que estas proteínas participem, direta ou indiretamente, de mecanismos relacionados à resistência a drogas em *Leishmania* spp. Em vermelho, proteína que foi menos abundante em ambas as linhagens analisadas, CYPA.

6 Conclusões

Apresentam-se como principais conclusões desta tese:

- ❖ A análise proteômica comparativa de linhagens de *L. braziliensis* e de *L. infantum* sensíveis e resistentes ao antimônio, mostrou que dos 132 *spots* proteicos exclusivos ou mais abundantes submetidos à análise LC/MS/MS, 80 *spots* proteicos foram identificados correspondendo a 57 proteínas distintas.
- ❖ As 57 diferentes proteínas identificadas por espectrometria de massa foram agrupadas em classes funcionais com base nos processos biológicos anotados no GeneDB (<http://www.genedb.org/>).
- ❖ A análise comparativa mostrou que muitos dos *spots* proteicos que apresentaram abundância diferencial em ambas as espécies de *Leishmania* estão envolvidos na defesa antioxidante, na resposta geral ao estresse, no metabolismo de glicose e aminoácidos e na organização do citoesqueleto.
- ❖ O fator de alongação 1-alfa foi superexpresso nas linhagens sensíveis de ambas as espécies analisadas LbWTS e LcWTS.
- ❖ As cinco proteínas mais abundantes nas linhagens resistentes de ambas as espécies de *Leishmania* estudadas são triparedoxina peroxidase, proteína de citoesqueleto alfa-tubulina e as proteínas de choque térmico HSP83, HSP70 e Hsp60.
- ❖ A análise proteômica mostrou que o nível de expressão da CYPA foi três vezes reduzido na linhagem LbSbR em comparação com o seu par sensível, LbWTS. As análises de *Western blotting* 1-DE e 2-DE confirmaram estes resultados. O anticorpo anti-TcCYPA reconheceu dois *spots* proteicos na linhagem LbWTS e um na LbSbR. Em *L. infantum*, ele reconheceu seis *spots* proteicos na linhagem LcWTS e cinco na LcSbR, correspondentes a diferentes isoformas da CYPA. Os dados mostraram que a expressão de CYPA foi menor em ambas as linhagens resistentes LbSbR e LcSbR em comparação com seus respectivos pares sensíveis LbWTS e LcWTS.
- ❖ A análise proteômica comparativa entre as linhagens LbWTS e LbSbR mostrou que a *pteridina reductase* (PTR1), foi identificada em um *spot* proteico exclusivo na amostra LbSbR. A análise entre as linhagens de *L. infantum* mostrou que a PTR1 não foi detectada entre as proteínas diferencialmente expressas identificadas. Os ensaios de *Western blotting* 1-DE e 2-DE confirmaram estes resultados. O anticorpo reconheceu

com maior intensidade um *spot* proteico correspondente à PTR1 na linhagem LbSbR, e o nível de expressão da proteína PTR1 foi similar entre as linhagens de *L. infantum*.

- ❖ Os nossos resultados de análise proteômica mostraram que cinco *spots* proteicos foram identificados como *triparedoxina peroxidase* (TRYP) na linhagem LbSbR e dois na LcSbR. Os ensaios de Western blotting 1-DE e 2-DE confirmaram estes resultados, mostrando maior expressão da TRYP nas linhagens resistentes de ambas as espécies de *Leishmania*.
- ❖ Em nosso estudo, dentre as proteínas identificadas por análise proteômica comparativa entre linhagens de *Leishmania* spp. sensíveis e resistentes ao antimonial, 17 foram identificadas anteriormente e as outras 40 proteínas foram observadas apenas em nossa análise proteômica. Acreditamos que algumas dessas proteínas estejam associadas à resposta geral ao estresse e outras possam estar associadas ao mecanismo de resistência ao antimônio em *Leishmania* spp.

Conclusão final:

Estes resultados mostram que o mecanismo de resistência de *Leishmania* spp. ao antimônio é complexo e multifatorial. Ressaltamos, também, que alguns mecanismos de resistência ao antimônio diferem entre as duas espécies de *Leishmania* analisadas neste estudo. Os resultados obtidos nesse projeto irão contribuir para o entendimento do fenótipo de resistência a drogas e do metabolismo destes parasitos. Dessa forma, estarão contribuindo para o desenvolvimento de novos alvos para a quimioterapia das Leishmanioses.

A partir da análise integrada de fatores fenotípicos, genômicos e transcritômicos será possível estabelecer estratégias de pesquisa básica e aplicada e contribuir para o entendimento da resistência de *Leishmania* aos antimoniais.

7 ANEXOS

7.1 Tabela de peptídeos das proteínas identificadas.

Tabela 1. Proteínas identificadas por análise de MS de spots com abundância diferencial em linhagens de *L. braziliensis* e de *L. infantum* sensíveis (WTS) e resistentes (SbR) a SbIII.

Spot nº	Protein identity	TriTrypDB Accession Nº <i>L. braziliensis/L. infantum</i>	Global MASCOT score ^c	Individual MASCOT score	Peptides	% Coverage/Matches ^a
1	Heat shock protein 83-1	LbrM33.0340	669			21 / 20(4)
2	Chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor	LbrM35.2250	460	37 61 51 75 74 78 60 23 (14) (15)	ERVELLR IEDALCSTR VGGSEVEVNEK ELEALANDSSLTR AAVQEGIVAGGGTALLR YVNMFEAGIIDPTR ASKELEALANDSSLTR TAMLQDMSVFTGAQLVGDEGTGLELDGENFDPSILGSVK TAMLQDM*SVFTGAQLVGDEGTGLELDGENFDPSILGSVK TAM*LQDMSVFTGAQLVGDEGTGLELDGENFDPSILGSVK	20 / 8(5)
3	Heat shock protein 70-related protein	LbrM26.1260	365			20 / 12(2)
4	Alpha tubulin	LbrM13.0190	562	36 51 40 63 (45) (51) 36 68 54 72 (26) (52) 68 13 23 37 (13)	LSVDYGKK DVNAAIATIK EIVDLALDR YMSCCLMYR YMSCCLM*YR YM*SCCLMYR QLFNPEQLVSGK LIGQVSSLTASLR TIQFVDWCPTGFK SLDIERPSYTNVNR SLDIERPSYTNVNR IHFVLTSYAPVVSAAEK IHFVLTSYAPVVSAAEK QLFNPEQLVSGKEDAANNYAR FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR AYHEQLSVADITNSVFEPAGMLTK AYHEQLSVADITNSVFEPAGM*LTk	35 / 17(5)
5	Apha tubulin	LbrM13.0190	118	25 70 23	QLFNPEQLVSGK CIFLDLEPTVVDEVR QLFNPEQLVSGKEDAANNYAR	7 / 3(1)
6	Apha tubulin	LbrM29.2700	346	41 (20) 38 (16) (42) 121 90 (30) 56	EIVDLALDR QLFNPEQLVSGK QLFNPEQLVSGK CIFLDLEPTVVDEVR CIFLDLEPTVVDEVR CIFLDLEPTVVDEVR QLFNPEQLVSGKEDAANNYAR CIFLDLEPTVVDEVRTGTYR CIFLDLEPTVVDEVRTGTYR	11 / 9(3)
7	Beta-tubulin	LbrM33.0920	185	54 28 72 (19) 31	INVYFDESAGGR IMMTFSVIPSPR AVLMDLEPGTMDSVR AVLM*DLEPGTMDSVR INVYFDESAGGRYVPR	10 / 5(2)
8	Beta-tubulin	LbrM21.2150	291	53 (40) 53 72 (10) (43) 10 66 36	LAVNLVPFPR FPGQLNSDLR FPGQLNSDLR AVLMDLEPGTMDSVR AVLM*DLEPGTMDSVR AVLMDLEPGTM*DSVR GLSVSELTQQMFDK EIVSCQAGQCGNQIGSK GHYTEGAELIDSVLDVCR	30 / 9(2)
9	Tryparedoxin peroxidase	LbrM15.1100	63	63	HATINDLPVGR	4 / 1(1)
10	Tryparedoxin peroxidase	LbrM15.1100	350	17 45 27 (36) 113 (15)	AGEFFEK GLFIIDKK HATINDLPVGR GGLGEMHIPVLADK GGLGEMHIPVLADK GGLGEM*HIPVLADK	47 / 14(2)

			(34)	GGLGEM*HIPVLADK		
			(39)	DYGVLIIEESGIALR		
			71	DYGVLIIEESGIALR		
			(37)	DYGVLIIEESGIALR		
			(26)	DYGVLIIEESGIALR		
			49	NTQVIAVSCDSVYSHLAWVNTPR		
			(19)	VLEAFQYADENGDAIPCGWKPGQPTLDTTK		
			28	VLEAFQYADENGDAIPCGWKPGQPTLDTTK		
11	Tryparedoxin peroxidase	LbrM15.1100	100	64	HATINDLPVGR	11 /
				36	DYGVLIIEESGIALR	2(1)
12	Tryparedoxin peroxidase	LbrM15.1100	300	45	GLFIIDKK	34 /
				(16)	HATINDLPVGR	10(3)
				63	HATINDLPVGR	
				(36)	GGLGEMHIPVLADK	
				78	GGLGEMHIPVLADK	
				(38)	GGLGEM*HIPVLADK	
				(26)	DYGVLIIEESGIALR	
				76	DYGVLIIEESGIALR	
				(25)	DYGVLIIEESGIALR	
				39	VLEAFQYADENGDAIPCGWKPGQPTLDTTK	
13	Tryparedoxin peroxidase	LbrM15.1100	151	63	HATINDLPVGR	19 /
				27	GGLGEMHIPVLADK	5(2)
				49	DYGVLIIEESGIALR	
				76	EAAPQFSGQAVVNGAIK	
				6	NTQVIAVSCDSVYSHLAWVNTPR	
14	Pteridine reductase 1	LbrM23.0300	382	93	SAADANTLAAATLNAR	31 /
				103	ASVGGTDGSAPVTLFK	5(4)
				39	ASVGGTDGSAPVTLFKR	
				74	DSSAAEVSDVVIFLCSSK	
				59	CDVLVNNASSFYPTPLLR	
15	3-hydroxyacyl-ACP dehydratase, MaoC, putative	LbrM07.0450	339	64	GLISLSNTVQK	45 /
				38	DKGLISLSNTVQK	9(5)
				59	TLQFEGESEWSVTK	
				(50)	EMPGPGTVYLSQNLNLR	
				72	EMPGPGTVYLSQNLNLR	
				(59)	EM*PGPGTVYLSQNLNLR	
				106	TVHISQENVNTFGDVIDDHNPiHSDPEAAK	
				(35)	TVHISQENVNTFGDVIDDHNPiHSDPEAAK	
				(36)	TVHISQENVNTFGDVIDDHNPiHSDPEAAK	
16	Proliferative cell nuclear antigen (PCNA), putative	LbrM15.1440	319	59	IVDGNDSLNR	36 /
				76	STVTLNSAEFAK	7(3)
				56	NIILGLNLASLSK	
				27	DMQVFGDTVTAISK	
				26	DSPCMVEYGIDNVGYLR	
				26	LLEIEAESMGIPEMDYR	
				49	FSSSGDVGQGYTFLQAAGVSDR	
17	Seryl-tRNA synthetase	LbrM19.0220	313	38	LGLMDTSK	13 /
				65	ALATQVESLAK	6(3)
				46	TQFLTEASKK	
				(49)	YAKPEIVDDIIEIDKR	
				65	YAKPEIVDDIIEIDKR	
				100	GLDIQLFRDPEMADIVR	
18	Small ubiquitin protein, putative (SUMO)	LbrM08.0500	99	62	VVNADGAEMFFK	20 /
				37	FLFDGAPIDEIK	2(1)
19	Enolase	LbrM14.1330	221	44	INQIGTISESIAAAK	16 /
				25	LGANAILGCSM*AISK	5(1)
				(25)	AQIVGDDLTVTNVER	
				99	AQIVGDDLTVTNVER	
				52	WVSEYPLVSIEDPFAEDNFDEFSAITK	
20	Reiske iron-sulfur protein precursor, putative	LbrM34.1450	305	29	QLEGNMPLTK	24 /
				32	WIDDNTIYMGK	11(3)
				(17)	WIDDNTIYMGKL	
				(62)	WIDDNTIYMGKL	
				66	WIDDNTIYM*GKL	
				(42)	QGPAPLNLEVPPYR	
				67	QGPAPLNLEVPPYR	
				52	VSLVFKQLEGNMPLTK	
				38	IRQGPAPLNLEVPPYR	
				22	YSDPALCDVDTSDVVLNNTYPEGAPQGR	
				(15)	YSDPALCDVDTSDVVLNNTYPEGAPQGR	
21	ATPase beta subunit, putative	LbrM25.1150	963	29	MAIHAEAPK	48 /
				41	IGLFGGAGVGK	26(12)
				45	VIDLKGESK	
				57	AMAEAAAAMEK	
				34	VIDLILPYCK	
				56	CIAMQTTDLLK	
				84	VVSTGGNISVPVGR	
				30	IFNVLGDAIDQR	

			67	TVIIMELINNVAK	
			(55)	TVIIM*ELINNVAK	
			(62)	VAQSALTMAYFR	
			69	VAQSALTM*AEYFR	
			37	EGTDLYLEMMQSK	
			(20)	EGTDLYLEM*MQSK	
			63	LADQAAEDTILTTGIK	
			(46)	CVLVYQGMNEPPGAR	
			72	CVLVYQGMNEPPGAR	
			32	TREGTDLYLEMMQSK	
			73	DVEGQNVLLFIDNIFR	
			60	AVAESGIYPAVNPLECASR	
			18	DEPLTLEIVQHLDANTGR	
			80	IPAAVGYQPTLAEDLGMLQER	
			(38)	IPAAVGYQPTLAEDLGMLQER	
			(12)	IPAAVGYQPTLAEDLGM*LQER	
			(8)	IPAAVGYQPTLAEDLGM*LQER	
22	Glucose-regulated protein 78, putative	LbrM28.1300	1217	ELQDIIAVLGIDELSEEDKVVVDR	
			21	FFVDGLK	36 /
			29	IAGLNVVR	22(14)
			59	LSEEEIER	
			64	EISETFLGEK	
			52	FDLSGIPPAPR	
			53	LQSVTNPIIQK	
			55	FEELNMALFK	
			59	NSLESIAYSLR.N	
			74	ITPSVVAFTDAER	
			69	AKFEELNMALFK	
			67	SDIDEIVLVGGSTR	
			61	GEVHIITNEMGNR	
			80	FTPPEVSAMVLQK	
			55	EALNFVDENPNADR	
			93	IINEPTAAAIA YGLNK	
			(24)	NAVVTVPAYFNDAQR	
			32	NAVVTVPAYFNDAQR	
			66	VEVDSLVEGHDFSEK	
			53	NQLPQNPENTIIYAIK	
			50	EALNFVDENPNADREDFEAAAR	
			(23)	GINPDEAVAYGAAVQAAVL TGESEVGGK	
			127	GINPDEAVAYGAAVQAAVL TGESEVGGK	
23	Cyclophilin a	LbrM25.0790	409	(17) GFGYSNSPFHR	63 / 13(6)
			73	GFGYSNSPFHR	
			67	PYKPYYPVVESNPK	
			(21)	PYKPYYPVVESNPK	
			119	HVVFGQVLEGYDVVK	
			(68)	HVVFGQVLEGYDVVK	
			82	VTMELFADAVPQTAENFR	
			(49)	VTMELFADAVPQTAENFR	
			(60)	VTM*ELFADAVPQTAENFR	
			(20)	VTM*ELFADAVPQTAENFR	
			25	VIPDFMCQGGDFTAGNGTGGK	
			(17)	VIPDFM*CQGGDFTAGNGTGGK	
			43	HFGPGTLSM*ANAGPNTNGSQFFLCTAPT SWLDGK	
24	Actin-like protein, putative	LbrM15.1280	229	70 LGFAGDTPVR.M	20 / 6(1)
			29	ILDLENVENNTPLLLTEK	
			29	EVCVLPDGTALPISGAAR	
			17	FIPGECYFQPSLSPALQQPR	
			44	DQSTVVDEVLLR	
			39	ADYNEVGPMMAVVR	
25	Paraflagellar rod protein 1D	LbrM31.0160	559	24 HIQDAIQK	21 / 12(7)
			66	TNQDLAALR	
			56	VCGLEMSQR	
			59	ADLEDAEAVKR	
			80	QGVEEELAMLK	
			38	WNLMEAYDLAK	
			61	SQLDATQLAQVPTR	
			60	VVSFTQLIDNSIAK	
			38	ENEEMQEEAWNK	
			43	VENAQFLEVAQAQHK	
			58	CTGLVEELVSEGCAGVK	
			4	QAAALDDFKSESEALDAAGIEF SHPVDENNEEVLTR	
26	Beta tubulin	LbrM33.0960	1485	48 LREEYPDR	42 /
			(45)	FPGQLNSDLR	53(25)
			66	FPGQLNSDLR	
			(35)	FPGQLNSDLR	
			(65)	FPGQLNSDLR	
			28	KLAVNLVPFPR	
			40	FPGQLNSDLRK	

			(66)	INVYFDESAGGR	
			(51)	INVYFDESAGGR	
			66	INVYFDESAGGR	
			(27)	INVYFDESAGGR	
			(58)	INVYFDESAGGR	
			(35)	INVYFDESAGGR	
			(66)	INVYFDESAGGR	
			(57)	INVYFDESAGGR	
			(16)	INVYFDESAGGR	
			(23)	INVYFDESAGGR	
			(26)	INVYFDESAGGR	
			(53)	INVYFDESAGGR	
			(23)	INVYFDESAGGR	
			(31)	INVYFDESAGGR	
			(39)	INVYFDESAGGR	
			(18)	INVYFDESAGGR	
			(53)	INVYFDESAGGR	
			(24)	INVYFDESAGGR	
			(53)	INVYFDESAGGR	
			(27)	IMMTFSVIPSPR	
			76	IMMTFSVIPSPR	
			(56)	IM*MTFSVIPSPR	
			(75)	IMM*TFVIPSPR	
			(71)	AVLMDLEPGTMDSVR	
			78	AVLMDLEPGTMDSVR	
			(22)	AVLMDLEPGTMDSVR	
			(69)	AVLM*DLEPGTMDSVR	
			(16)	AVLMDLEPGTM*Dsvr	
			(66)	EIVSCQAGQCQNIGSK	
			(35)	EIVSCQAGQCQNIGSK	
			119	EIVSCQAGQCQNIGSK	
			134	GHYTEGAELIDSVLDVCR	
			(55)	GHYTEGAELIDSVLDVCR	
			(50)	GHYTEGAELIDSVLDVCR	
			(58)	GHYTEGAELIDSVLDVCR	
			88	AGPYGQLFRPDNFIGQSGAGNNWAK	
			182	FWEVIADEHGVDPTGSYQGSDLQLER	
			(47)	FWEVIADEHGVDPTGSYQGSDLQLER	
			(6)	FWEVIADEHGVDPTGSYQGSDLQLER	
			(42)	FWEVIADEHGVDPTGSYQGSDLQLER	
			(19)	FWEVIADEHGVDPTGSYQGSDLQLER	
			(26)	FWEVIADEHGVDPTGSYQGSDLQLER	
			(75)	FWEVIADEHGVDPTGSYQGSDLQLER	
			245	EAESCDCLQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLISK	
			(80)	EAESCDCLQGFQLSHSLGGGTGSGM*GTLISK	
			63	VSDTVVEPYNTTSLVHQLVENSDESMCIDNEALYDICFR	
27	RNA-binding protein, putative	LbrM34.2130	557	YTDLIADR	39 / 14(7)
			56	SQQVPEVGR	
			40	ETFQQVGLVER	
			73	ETFQQVGLVER	
			(70)	ETFQQVGLVER	
			23	FDDGPRPPLVQR	
			93	DMMPAYGNTAPQSR	
			(17)	DM*MPAYGNTAPQSR	
			(37)	DMM*PAYGNTAPQSR	
			93	GSALVTMMTVEGAENAIR	
			82	LFVSNLFPDCTNSALR	
			(35)	GSALVTM*MTVEGAENAIR	
			98	SEDEAQIAIAEFDGIEMANR	
			(13)	SEDEAQIAIAEFDGIEMANR	
			(26)	SEDEAQIAIAEFDGIEM*ANR	
28	Elongation factor 1-alpha	LbrM17.0090	680	QTVAVGIK	35 / 25(5)
			28	TVMYAQSR	
			30	LPLQDVYK	
			43	IGGIGTVPVGR	
			61	QMVVCCNK	
			22	SDNMPWYK	
			27	SDNM*PWYK	
			(12)	FIPISGWQGDNMIDK	
			(13)	FIPISGWQGDNMIDK	
			(28)	FIPISGWQGDNMIDK	
			(15)	FIPISGWQGDNM*IDK	
			51	FIPISGWQGDNM*IDK	
			(41)	MVPQKPMCVEVFNDYAPLGR	
			(46)	MVPQKPM*CVEVFNDYAPLGR	
			47	M*VPQKPMCVEVFNDYAPLGR	
			(34)	M*VPQKPM*CVEVFNDYAPLGR	
			(16)	VETGIMKPGDVVTFAPANVTTEVK	
			81	VETGIM*KPGDVVTFAPANVTTEVK	
			75	GPTLLDALDMLEPPVRPVDKPLR	

			(10)	GPTLLDALDMLEPPVRPVDKPLR	
			77	SIEMHHEQLAEAQPGDNVGFNVK	
			(66)	SIEMHHEQLAEAQPGDNVGFNVK	
			(44)	GPTLLDALDM*LEPPVRPVDKPLR	
			(22)	GPTLLDALDM*LEPPVRPVDKPLR	
			(4)	GPTLLDALDM*LEPPVRPVDKPLR	
			(18)	SIEM*HHEQLAEAQPGDNVGFNVK	
29	Nascent polypeptide associated complex subunit-like protein, copy 1	LbrM04.0750	181	28 EINVMSQANVSR	40 / 5(1)
			(26)	TGSLSFAMVQPEVYR	
			48	TGSLSFAM*VQPEVYR	
			(52)	FPGTNTFVIFGEAQLEDTSALAQEAAAR	
			137	FPGTNTFVIFGEAQLEDTSALAQEAAAR	
30	ATPase beta subunit, putative	LbrM25.1150	291	56 TVIIMELINNVAK	20 / 6(4)
			46	LADQAAEDTILTTGIK	
			(55)	DEPLTLEIVQHLDANTGR	
			88	DEPLTLEIVQHLDANTGR	
			75	ELQDIIAVLGIDELSEEDKVVVDR	
			25	GSITSVQAVYVPADDITDPAPATTFSHLDATTVLDR	
31	Vacuolar ATP synthase subunit B, putative	LbrM28.2630	554	18 NIEGIPINPR	38 / 13(5)
			49	FICQGFYETR	
			61	AVNGPLVILEDVR	
			65	VMELGVSEDMMLGR	
			29	QLYPPINILPSLSR	
			65	LALTTAEYLAYDCGK	
			77	AVVQVFEGTSGIDVMR	
			83	TVLFLNLANOPTIER	
			52	DIFQSLDLCWELLR	
			22	AVVGEEALSSEDLLYLEFLDK	
			39	VYPEEMIQTGISSIDVMTSISR	
			13	AGSITQIPILSMPNDDITHPIPDLTGYITEGQIYVDR	
			(10)	AGSITQIPILSMPNDDITHPIPDLTGYITEGQIYVDR	
32	Aminoacylase, N-acyl-L-amino acid amidohydrolase, putative	LbrM20.5930	247	55 GGAGEGPMYALR	22 / 7(1)
			67	LTPNSVVADLR	
			(23)	GGAGEGPM*YALR	
			57	FVFQHAEEVVPSPGAK	
			(36)	ADMDALPLQEESGEPFSSK	
			40	ADM*DALPLQEESGEPFSSK	
			27	R.HIHEYVAYVEEQPTADYVADVLSMPAPLDIR	
33	Nitrilase, putative	LbrM26.2200	340	25 YPFLAWK	37 / 7(4)
			39	AVTMITEAAK	
			67	ENSIWIVAGSIPEK	
			78	LFNSSMTFGSDGALK	
			(57)	LFNSSM*TFGSDGALK	
			64	AVDNQYVFLCSPAR	
			34	FDEGEVLSAGNDATAISLDENVK	
			58	DTSAEYVAWGHSMVVDPPFGNVLSLDEK	
34	Glutamine synthetase, putative	LbrM06.0350	432	19 IPNAVASEGK	32 / 14(6)
			49	VTYIWLSGK	
			(24)	VSEFSAGVGTR	
			71	VSEFSAGVGTR	
			62	TMYLSQENVAK	
			24	DIIFYGSENNK	
			(58)	TM*YLSQENVAK	
			25	DIIFYGSENNKR	
			(29)	RPAGDADPYLVTSR	
			34	RPAGDADPYLVTSR	
			(63)	AENGLEVIHQYIDR	
			70	AENGLEVIHQYIDR	
			9	GLDTEILLKPVNAFPCCCLPR	
			71	ELLANGVFPVWNFDGSSSTGQAK	
35	Cathepsin L-like	LbrM08.0830	134	34 SGVLTACIGK	19 / 3(1)
			85	NSWGGDWGEQGYVR	
			16	VVMGVNACLLSEYPVSAHVR	
36	Protein phosphatase, putative [<i>L. braziliensis</i>]/gi 322505063	LbrM25.0630	809	67 VDGSLAVSR	43 / 19(8)
			56	VCEEAIER	
			52	LGSGSQLEQK	
			32	ESIPMTDER	
			84	GNTTVGALLEK	
			49	VIALADIQHK	
			14	WFSNYFQK	
			(41)	VHLQVGNVGDSDR	
			71	VHLQVGNVGDSDR	
			(8)	EGGSTGTFVALK	
			101	EGGSTGTFVALK	
			(11)	DNISCMIVQFK	
			67	DNISCMIVQFK	
			(25)	R.DNISCMI*IVQFK	
			42	LCEAASNGPSDQMER	

37	Surface antigen protein, putative	LbrM12.0750	222	30	QQLETCNDLAEVAGR	18 / 7(3)					
				64	DGSDYAAEPHTTVVPGPFSAPR						
				80	VVACIDGMCVPLTEDHKPNNEGER						
				(17)	VVACIDGMCVPLTEDHKPNNEGER						
				(35)	QLTVLDLEGTK						
				60	QLTVLDLEGTK						
				(31)	QLTVLDLEGTK						
				42	VSGTLPSEWSGMAK						
				(69)	AIPALGDTWTGSDFCSWK						
				69	AIPALGDTWTGSDFCSWK						
38	Hypothetical protein, conserved	LbrM09.0120	634	51	AEAVQLENCGLSGSLPPSWSAMPK	31 / 14(5)					
				16	M*FDVEDFK						
				16	NVASADQVLR						
				71	VVFSEFDNK						
				43	AFWEEDQMR						
				91	SYAAGASSTALVPR						
				72	LMSEASSYLGNMNR						
				95	AVASTSNALAPYTGGR						
				22	AAALVSDADAADDKVR						
				50	LYPIMTDCLYFR						
39	Hypothetical protein, conserved	LbrM23.1530	408	(40)	AHQAAEQAALEADQAK	33 / 9(4)					
				43	AHQAAEQAALEADQAK						
				76	SLENAETDVADAQSAVK						
				15	ETQKPIPPATKPTATTALSR						
				25	QGFHNMGLDFSSATVEDLFR						
				26	AVLQLVLR						
				59	ETTVAAALLR						
				58	SQVDSILER						
				56	AQEELASVQR						
				(52)	AQEELASVQR						
40	Hypothetical protein, conserved	LbrM26.2570	203	77	VEQQGVVLDSTK	8 / 3(2)					
				32	VLSGVSPSEGQAM*EK						
				101	LADAAVDAGNATQALSVLEK						
				54	LANLQNETR						
				72	SIQAEIDAIMK						
				77	GVNFSDCMDAR						
				41	Hypothetical protein, conserved		LbrM35.6250	942	63	VMMPIAESR	36 / 27(14)
									(36)	FAGGPAMTER	
									59	FAGGPAMTER	
									(41)	VM*MPIAESR	
(36)	VMM*PIAESR										
(36)	FAGGPAM*TER										
58	KVMMPIAESR										
(40)	KVMM*PIAESR										
(57)	AFTDALATSGAR										
65	AFTDALATSGAR										
42	Heat-shock protein hsp70, putative	LinJ.28.3060	294	61	TLGVFELLQAK	9 / 6(2)					
				(21)	LTAASAPQSSPLAK						
				93	LTAASAPQSSPLAK						
				94	IALYSSGSIEAQK						
				(56)	IALYSSGSIEAQK						
				(30)	IALYSSGSIEAQK						
				(20)	IALYSSGSIEAQK						
				(50)	DWKDEAANEVTR						
				98	DWKDEAANEVTR						
				71	VVQAAIWAEVFAEGK						
43	Heat shock protein, putative	LinJ.18.1350	87	(41)	NALSCFVAQLELTR	4 / 2(1)					
				101	NALSCFVAQLELTR						
				(92)	NALSCFVAQLELTR						
				(52)	SEFCALFHSEIER.G						
				109	SEFCALFHSEIER.G						
				(29)	LQSQVFPDVNTFFR						
				71	LQSQVFPDVNTFFR						
				44	Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor, putative		LinJ.30.2530	708	46	DAGTIAGLEVLR	26 / 16(6)
									49	LVTFFTEEFK	
									79	TFTPEEISSMVLK	
(30)	TFTPEEISSM*VLLK										
88	IINEPTAAAIAYGLDK										
33	NQVAMNPHNTVFDK										
32	SPSSVPLPQVVK										
55	LSSSGMLIEYAAPDAAANFVR										
35	TTPSVVAFK										
38	EQIEQMIR										
				35	DAGTIAGLNVR						
				(27)	EINDVVLVGGMTR						
				(20)	MKETAENFLGHK						
				38	MKETAENFLGHK						
				34	EINDVVLVGGM*TR						
				81	QYSPSQIGAFVLEK						
				81	QAITNPQSTFYAVK						
				83	VVNEPTAAALAYGMDK						

			(42)	VVNEPTAAALAYGM*DK	
			114	SQTFSTAADNQTVQGIK	
			115	GVNPDEAVALGAATLGGVLR	
			(106)	GVNPDEAVALGAATLGGVLR	
			45	VSNAVVTCPAYFNDAQR	
			9	EMAADNQMMGQFDLVGIPPAPR	
45	Chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	LinJ.36.2140	341	63 GYVSPYFVTDAK	15 / 6(4)
			94	AELEDALVMSAK	
			66	ELESLANDSSLTR	
			28	DDTVMLNGGGDAAAVK	
			27	AAVQEGIVAGGGTALLR	
			65	VLEASEESVGYDAQNDR	
46	Heat shock protein 83-1	LinJ.33.0350	547	46 SIYYITGDSK	17 / 12(3)
			35	APFDMFEPNK	
			35	ADLVNNLGTIAR	
			49	DSSMAQYMMSK	
			(39)	EDQLEYLEPR	
			55	EDQLEYLEPR	
			27	KLESSPFIEQAR	
			57	AISNDWEDPMATK	
			74	GVVDSDELPLNISR	
			71	FYSTESGEEMTTLK	
			(42)	FYSTESGEEM*TTLK	
			97	YQSLTDPSVLGESPR	
47	Actin	LinJ.04.1250	104		11 / 2(1)
48	Alpha tubulin	LinJ.13.1450	164	52 CIFLDLEPTVVDEV R	11 / 3(1)
			62	QLFNPEQLVSGK	
			49	EIVDLALDR	
49	Alpha tubulin	LinJ.13.1450	81	63 QLFNPEQLVSGK	6 / 2(1)
			18	FDGALNVDLTFEQTNLVPYPR	
50	Peroxiredoxin, putative (Tryparedoxin peroxidase)	LinJ.23.0050	160	20 DINMNDYK	27 / 4(1)
			65	HSTINDLPVGR	
			41	GGLGEMHIPVLADK	
			34	VLEAFQYADENGDAIPCGWKPGQPTLDTTK	
51	Peroxiredoxin, putative (Tryparedoxin peroxidase)	LinJ.23.0050	352	44 GLFIIDKK	34 / 13(5)
			(27)	GLFIIDKK	
			32	DINMNDYK	
			69	HSTINDLPVGR	
			(54)	GGLGEMHIPVLADK	
			112	GGLGEMHIPVLADK	
			(50)	GGLGEM*HIPVLADK	
			(83)	GGLGEM*HIPVLADK	
			76	DYGV LIEESGIALR	
			(33)	DYGV LIEESGIALR	
			(30)	DYGV LIEESGIALR	
			(60)	DYGV LIEESGIALR	
			18	LNTQVAVSCDSVYSHLAWVNTPR	
52	Elongation factor 2	LinJ.36.0200	290	67 VNFTVDQVR	7 / 5(2)
			51	LWGDNFFDAK	
			16	ELM*DYPDQIR	
			115	STLSDSLVGAAGIHK	
			41	AILELQLDP EEA YQGFVK	
53	Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit, putative	LinJ.25.1790	250	22 HTLSSIK	28 / 8(2)
			27	DAIHSALDEELAR	
			36	LAAEGVQAEVINLR	
			65	VFVIGEEVGQYQGAYK	
			19	DIEM*ASQPQVADVMAAAK	
			13	DDNAV VVLEHELLYSESPVTDEVADK	
			(7)	AAIRDDNAV VVLEHELLYSESPVTDEVADK	
			69	AAIRDDNAV VVLEHELLYSESPVTDEVADK	
54	Inorganic pyrophosphatase, putative	LinJ.03.0890	112	72 ILGVLGLIDEGETDWK	22 / 2(1)
			41	VGATDAIVSAWHDLPLYAGASDDQLVLTVCVTEIPK	
55	Isocitrate dehydrogenase, putative	LinJ.33.2680	118	34 ALSTAEGEAIHK	12 / 3(1)
			70	FPETSAYGVKPVSLGSR	
			13	ENTEDIYSGIEWDQGTPEAAK	
56	S-adenosylmethionine synthetase	LinJ.30.3560	255		14 / 5(3)
57	2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7- dioic acid aldolase, putative	LinJ.25.2090	107	53 GLLGYVPESNK	10 / 3(1)
			54	YVFPQMYFSPELQAATDK	
			(24)	YVFPQM*YFSPELQAATDK	
58	Aminopeptidase P1 (Metallo- peptidase, Clan MG, Family M24), putative	LinJ.02.0010	273	68 AGDQNAIEYLK	9 / 5(3)
			65	GATDLNEYDAATK	
			57	IENLEEVVECR	
			25	TICFTAPSDEQR	
			58	DLIDVSLLTETER	
59	Protein phosphatase 2C-like protein	LinJ.36.0560	97	62 VNMTLAVSR	10 / 2(1)
			16	FSTVFETSHLR	
60	Protein phosphatase, putative	LinJ.25.0780	458	(31) GNTTVGALLER	29 / 20(6)
			(20)	GNTTVGALLER	
			70	GNTTVGALLER	
			(28)	IDQEWMDSGR	
			48	IDQEWMDSGR	
			(30)	VHLQVGNVGD SR	
			47	VHLQVGNVGD SR	
			71	EGGSTGTFFFVALK	
			(67)	EGGSTGTFFFVALK	
			(53)	EGGSTGTFFFVALK	

			62	DNISCMIVQFK	
			(48)	DNISCMIVQFK	
			60	QQLETCNDLAEVAGR	
			(17)	DGSDYAAEPHTTVVPGPFSAPR	
			(16)	DGSDYAAEPHTTVVPGPFSAPR	
			73	DGSDYAAEPHTTVVPGPFSAPR	
			(16)	DGSDYAAEPHTTVVPGPFSAPR	
			29	VVACIDGVCVPLTEDHKPNNEGER	
			(16)	VVACIDGVCVPLTEDHKPNNEGER	
			(7)	VVACIDGVCVPLTEDHKPNNEGER	
61	Biotin/lipoate protein ligase-like protein	LinJ.31.1070	138	62	16 / 3(2)
				58	
				18	
62	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase-like protein	LinJ.32.3810	59	27	13 / 3(1)
				18	
				15	
63	Rab7 GTP binding protein, putative	LinJ.18.0890	57		4 / 1(1)
64	Hypothetical protein, conserved	LinJ.36.6170	214	57	19 / 5(3)
				(74)	
				106	
				16	
				36	
65	Hypothetical protein, conserved	LinJ.32.0660	142	57	19 / 4(1)
				33	
				(25)	
				52	
66	Hypothetical protein, conserved	LinJ.35.4540	99	52	11 / 2(1)
				46	
67	Hypothetical protein, conserved	LinJ.34.2410	61	45	14 / 2(1)
				16	
68	Hypothetical protein, conserved	LinJ.27.1920	160	39	11 / 2(1)
				121	
69	Hypothetical protein, conserved	LinJ.35.1220	99	20	27 / 3(1)
				34	
				45	
70	Hypothetical protein, conserved	LinJ.26.1960	144	49	6 / 3(1)
				28	
				69	
71	Hypothetical protein, conserved	LinJ.34.2530	57		5 / 1(1)
72	Stress-induced protein sti1	LinJ.08.1020	706	43	29 /
				30	15(3)
				38	
				48	
				66	
				56	
				(37)	
				50	
				49	
				42	
				90	
				37	
				36	
				77	
				46	
73	Heat shock protein 83-1	LinJ.33.0360	777	40	24 /
				51	14(4)
				53	
				44	
				76	
				76	
				41	
				21	
				92	
				54	
				121	
				29	
				52	
				26	
74	Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor, Putative	LinJ.30.2480	1448	23	39 / 27(8)
				25	
				44	
				58	
				55	
				47	
				56	
				55	
				81	
				62	
				13	
				(54)	
				(59)	
				79	
				95	
				51	

			149	SQTFSTAADNQTQVGIK	
			126	AMENPNVAKDDLAAATDK	
			108	GVNPDEAVALGAATLGGVLR	
			(88)	GVNPDEAVALGAATLGGVLR	
			29	VSNAVVTCPAYFNDAQR	
			(24)	EMAADNQMMGQFDLVGIPPAPR	
			(16)	EMAADNQMMGQFDLVGIPPAPR	
			74	EMAADNQMMGQFDLVGIPPAPR	
			(21)	EMAADNQMMGQFDLVGIPPAPR	
			(26)	EMAADNQMM*MGQFDLVGIPPAPR	
			(28)	EMAADNQMM*GQFDLVGIPPAPR	
75	RNA helicase, putative	LinJ.21.1820	418	19 DVQEIFMK	17 /
			56	IMVATDLFGR	8(4)
			64	AMLGADILAAQAK	
			38	EVPAILVGTTPGR	
			59	DATEIYVDQR	
			76	GLTIAFITTDEK	
			33	ELAYQIEQEFK	
			71	TAVFVFALLEQVEK	
76	Elongation factor 1-alpha	LinJ.17.0090	148	41 LPLQDVYK	11 /
			55	IGGIGTVPVGR	4(1)
			(26)	VETGIMKPGDVVTFAPANVTTEVK	
			36	VETGIM*KPGDVVTFAPANVTTEVK	
77	Enolase	LinJ.14.1240	1247	18 YIAGLAGTK.D	65 /
			(34)	SACNSLLLK.I	50(22)
			(33)	SACNSLLLK.I	
			42	SACNSLLLK.I	
			37	KM*YNLTFK.N	
			(54)	MGSEVYHALK	
			(55)	MGSEVYHALK	
			63	M*GSEVYHALK	
			(40)	NVNEILAPALVGK	
			58	NVNEILAPALVGK	
			(46)	NVNEILAPALVGK	
			61	LGANAILGCSMAISK	
			86	INQIGTISESIAAAK.L	
			(80)	INQIGTISESIAAAK	
			(45)	LGANAILGCSM*AISK	
			(24)	LGANAILGCSM*AISK	
			(112)	AQIVGDDLTVTNVER	
			113	AQIVGDDLTVTNVER	
			(47)	AQIVGDDLTVTNVER	
			(47)	AQIVGDDLTVTNVER	
			(98)	AQIVGDDLTVTNVER	
			(72)	AQIVGDDLTVTNVER	
			(18)	HIDEPLPILMEAIEK	
			(60)	HIDEPLPILMEAIEK	
			80	HIDEPLPILMEAIEK	
			(50)	HIDEPLPILMEAIEK	
			(65)	HIDEPLPILM*EAIEK	
			(66)	HIDEPLPILM*EAIEK	
			48	SAVPSGASTGVHEACELR	
			64	GNPTVEVELMTEAGVFR	
			(42)	HAGNVLPFQEFMIAPTK	
			65	HAGNVLPFQEFMIAPTK	
			(36)	HAGNVLPFQEFM*IAPTK	
			(47)	HAGNVLPFQEFM*IAPTK	
			(21)	YGQDAVNVGDEGGFAPPIK	
			60	YGQDAVNVGDEGGFAPPIK	
			(20)	YGQDAVNVGDEGGFAPPIK	
			(32)	FAICMDC AASEAYDAER	
			93	FAICMDC AASEAYDAER	
			103	NPEPTYVSAELQATYER	
			(24)	NPEPTYVSAELQATYER	
			(77)	SGETEDTYIADLSVGLGTGQIK	
			(54)	SGETEDTYIADLSVGLGTGQIK	
			81	SGETEDTYIADLSVGLGTGQIK	
			90	NVNEILAPALVGKDESDQAGLDK	
			(46)	NVNEILAPALVGKDESDQAGLDK	
			(38)	NVNEILAPALVGKDESDQAGLDK	
			(44)	NVNEILAPALVGKDESDQAGLDK	
			(80)	WVAEYPLVSIEDPFAEDNFDEFSAITMALAGK	
			84	WVAEYPLVSIEDPFAEDNFDEFSAITM*ALAGK	
		LinJ.35.1540	28	IEATAGVALK	
			49	QCTTVVWR	
			62	QGPAPLNLEVPYR	
78	Reiske iron-sulfur protein precursor, putative		251	24 DYDASM*WDEEFFR	30 /
			63	EVMETPLSALKDPETDEAR	7(2)
			(39)	EVM*ETPLSALKDPETDEAR	
		LinJ.36.3100	25	YSDPALCDVDTSDVVLNTYPEGAPQGR	
			28	VEFGIACK	
			31	IITGDSNVK	
			39	HMLGNTLVTK	
79	Succinyl-CoA ligase, putative [GDP-forming] beta-chain		353	69 ELGFAGETAER	24 /
			57	TIEEVEAACAK	8(2)
			94	GIFALEDTQIDSK	
			17	VNVAEGVDHDAAVAYAK	
			18	SASPMFIGSAEGGMSIEELAK	

	LinJ.05.0350	20	ESLCPNWK	
		39	TPAYFYESGK	
		42	ESGGFGWEMDR	
80	Trypanothione reductase	46	LMVTGAQYM*DLIR	30 /
		(43)	LGVPGDFCITSNEAFYLEDAPK	8(1)
		54	LGVPGDFCITSNEAFYLEDAPK	
		46	KSEDPHSDVLETLDTEYILIAATGSPTR	
		22	IITNESNGEVLGVHMLGDSAPEIIQSVGICMK	

* Oxidation (M). In this study a protein was considered a good identification if at least one peptide was confidently matched with database sequences, and an MASCOT score above 51 for individual peptides were considered significant for identity ($p < 0.05$ - peptide that reached probability greater than 95%). ^a% Coverage/ Matches - sequence covered percentage/number of peptides matched (Number in brackets indicate the number of peptides that reached probability greater than 95%). Tandem mass spectra were searched against the NCBI nonredundant database using the MASCOT software (<http://www.matrixscience.com>).

7.2 Artigo publicado



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology



Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines

Fabiana S.V. Matrangolo^{a,b}, Daniel B. Liarte^{a,c}, Laila C. Andrade^a, Melina F. de Melo^a, Juvana M. Andrade^a, Rafael F. Ferreira^a, André S. Santiago^d, Carlos P. Pirovani^d, Rosiane A. Silva-Pereira^a, Silvane M.F. Murta^{a,*}

^aLaboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou CPqRR/Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, CEP 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil

^bLaboratório de Epidemiologia e Biocontrole de Microrganismos, Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes, Montes Claros, Brazil

^cUniversidade Federal do Piauí – UFPI, Piauí, Brazil

^dLaboratório de Proteômica, Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 December 2012

Received in revised form 19 June 2013

Accepted 24 June 2013

Available online 4 July 2013

Keywords:

Leishmania braziliensis

Leishmania infantum chagasi

Antimony resistance

Proteome

2-DE

Cyclophilin-A

Pteridine reductase

Tryparedoxin peroxidase

ABSTRACT

The emergence of drug-resistant *Leishmania* species is a significant problem in several countries. A comparative proteomic analysis of antimony-susceptible and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* (LbSbR) and *Leishmania infantum chagasi* (LcSbR) lines was carried out using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by mass spectrometry (LC/MS/MS) for protein identification. Out of 132 protein spots exclusive or up-regulated submitted to MS, we identified 80 proteins that corresponded to 57 distinct proteins. Comparative analysis of data showed that most of the protein spots with differential abundance in both species are involved in antioxidant defense, general stress response, glucose and amino acid metabolism, and cytoskeleton organization. Five proteins were commonly more abundant in both SbIII-resistant *Leishmania* lines: tryparedoxin peroxidase, alpha-tubulin, HSP70, HSP83, and HSP60. Analysis of the protein abundance by Western blotting assays confirmed our proteomic data. These assays revealed that cyclophilin-A is less expressed in both LbSbR and LcSbR lines. On the other hand, the expression of pteridine reductase is higher in the LbSbR line, whereas tryparedoxin peroxidase is overexpressed in both LbSbR and LcSbR lines. Together, these results show that the mechanism of antimony-resistance in *Leishmania* spp. is complex and multifactorial.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, and this is one among the six major tropical diseases in developing countries according to the World Health Organization (WHO). It is estimated that 12 million people are infected and 350 million are at risk of infection [1]. Leishmaniasis includes a spectrum of diseases with clinical and pathological characteristics represented by visceral (VL), cutaneous (CL), and mucocutaneous forms (MCL) [2]. The difficulties in controlling the vectors, in

eliminating domestic reservoirs and in obtaining an accurate diagnosis of patients has led to an increased occurrence of deaths [1,3].

Pentavalent antimonials (SbV) are being used as first line drugs in the treatment of all leishmaniasis forms in South America, North Africa, Turkey, Bangladesh, and Nepal. Despite its use for treatment of leishmaniasis for over 70 years, the mechanism of action of antimony is still unclear. Studies suggest that SbV inhibits macromolecular biosynthesis in amastigotes [4], possibly altering energy metabolism by inhibiting glycolysis and fatty acid oxidation [5]. Other studies show that trivalent antimony (SbIII) causes disturbances in the thiol redox potential, which would lead to parasite death [6].

The emergence of antimony-resistant *Leishmania* species is a relevant problem in several countries. The resistance to this class of drugs has reached epidemic proportions in Bihar (India), where more than 60% of patients with visceral leishmaniasis were unresponsive to SbV treatment [7,8]. Even though the mechanism of antimony-resistance in *Leishmania* spp. has been widely studied,

Abbreviations: SbIII, potassium antimonyl tartrate; LbWTS, *L. (V.) braziliensis* Wild-type; LbSbR, *L. (V.) braziliensis* SbIII-resistant; LcWTS, *L. (L.) infantum chagasi* Wild-type; LcSbR, *L. (L.) infantum chagasi* SbIII-resistant; 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis; MS, mass spectrometry.

* Corresponding author. Tel.: +55 31 33407786; fax: +55 31 32953566.

E-mail addresses: silvane@cpqrr.fiocruz.br, smurta@yahoo.com (S.M.F. Murta).

0165-6851/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.06.006

8 REFERENCIAS

ADRIANO, M.-A. et al. Proof of interaction between Leishmania SIR2RP1 deacetylase and chaperone HSP83. **Parasitology research**, v. 100, n. 4, p. 811-8, mar. 2007.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, jan. 2012.

ANACLETO, C. et al. Structural and functional analysis of an amplification containing a PGPA gene in a glucantime-resistant Leishmania (Viannia) guyanensis cell line. **Parasitology Research**, v. 90, n. 2, p. 110-118, 2003.

ANDERSON, N. L. et al. Comparison of African trypanosomes of different antigenic phenotypes, subspecies and life cycle stages by two-dimensional gel electrophoresis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, n. 3, p. 299-314, 1985.

ANDRADE, M. et al. Proteomic Analysis of Trypanosoma cruzi Resistance to research articles. **J. Proteome Res.**, v. 7, p. 2357-2367, 2008.

ARAVIND, L.; IYER, L. M.; ANANTHARAMAN, V. The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism. **Genome Biol.**, v. 4, n. 10, p. R64, jan. 2003.

ATWOOD, J. A. et al. The Trypanosoma cruzi proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473-476, 2005.

AVILÁN, L. et al. Enolase: A Key Player in the Metabolism and a Probable Virulence Factor of Trypanosomatid Parasites—Perspectives for Its Use as a Therapeutic Target. **Enzyme research**, v. 2011, p. 932549, 2011.

BANERJEE, R. et al. Crystallization and preliminary X-ray analysis of cyclophilin from Leishmania donovani. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 58, n. Pt 10 Pt 2, p. 1846-1847, 2002.

BENTE, M.; HARDER, S.; WIESGIGL, M. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite Leishmania donovani. ..., n. iii, p. 1811-1829, 2003.

BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 273-281, maio. 2003.

BERHE, N. et al. Electrocardiographic findings in Ethiopians on pentavalent antimony therapy for visceral leishmaniasis. **East African medical journal**, v. 78, n. 11, p. 608-610, 2001.

BERMAN, J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 289-294, 2006.

BERMAN, J. D. et al. Activity of purine analogs against Leishmania donovani in vivo. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 31, n. 1, p. 111-3, jan. 1987.

BERMAN, J. D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 27, n. 6, p. 916-920, 1985.

- BIYANI, N. et al. Differential expression of proteins in antimony-susceptible and -resistant isolates of *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 179, n. 2, p. 91-99, 25 jun. 2011.
- BORST, P. Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 701-732, 1986.
- BORST, P.; OUELLETTE, M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 427-460, 1995.
- BRADFORD. Bradford Protein Assay. **Methods**, v. 2003, n. Bradford 1976, p. 1-4, 1976.
- BRITTO, C. et al. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. **Gene**, v. 222, n. 1, p. 107-117, 1998.
- BROCHU, C.; HAIMEUR, A.; OUELLETTE, M. The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Stress Chaperones**, v. 9, n. 3, p. 294-303, jan. 2004.
- BROCHU, C.; WANG, J.; ROY, G. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 10, p. 3073-3079, 2003.
- BROTHERTON, M. et al. Analysis of Stage-Specific Expression of Basic Proteins in *Leishmania infantum* research articles. p. 3842-3853, 2010.
- BUKAU, B.; HORWICH, A L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92, n. 3, p. 351-66, 6 fev. 1998.
- CASTRO, H. et al. Two linked genes of *Leishmania infantum* encode tryparedoxins localised to cytosol and mitochondrion. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 137-147, ago. 2004.
- COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2959-2963, 2008.
- COSTA, J. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil. **GAZETA MÉDICA DA BAHIA**, v. 1, n. 1c, p. 3-17, 2004.
- CRLEISH-IPEC/FIOCRUZ. Manual de Rotinas do Centro de Referência em Leishmanioses CRLeish. p. 1-35, 2004.
- CROFT, S. L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1041-1047, 1996.
- CROFT, S.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.
- CUERVO, P. et al. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **J. Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 79-92, 2 dez. 2009.
- CUERVO, P.; DOMONT, G. B.; DE JESUS, J. B. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. **J. Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 845-67, 10 mar. 2010.

- DA SILVA, E. . C. Partial purification, immunogenicity and putative new localization of a native Leishmania heat shock protein 70. p. 4 - 11, 2008.
- DANESHVAR, H. et al. Comparative proteomics profiling of a gentamicin-attenuated Leishmania infantum cell line identifies key changes in parasite thiol-redox metabolism. **J. Proteomics**, v. 75, n. 5, p. 1463-71, 16 fev. 2012.
- DE MORAIS-TEIXEIRA, E. et al. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant Leishmania species of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 475-8, jun. 2011.
- DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **The Biochemical journal**, v. 381, n. Pt 2, p. 405-412, 2004.
- DESJEUX, P. Global control and Leishmania HIV co-i. **Clin Dermatol.**, v. May-Jun;17, n. 3, p. 317-25, 1999.
- DO MONTE-NETO, R. L. et al. Gene Expression Profiling and Molecular Characterization of Antimony Resistance in Leishmania amazonensis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 5, p. e1167, maio. 2011.
- DRUMMELSMITH, J. et al. Proteome mapping of the protozoan parasite Leishmania and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 2, n. 3, p. 146-55, mar. 2003.
- DRUMMELSMITH, J. et al. Differential protein expression analysis of Leishmania major reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 32, p. 33273-80, 6 ago. 2004.
- DUTTA, M. et al. Lack of abundance of cytoplasmic cyclosporin A-binding protein renders free-living Leishmania donovani resistant to cyclosporin A. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 22, p. 19294-300, 1 jun. 2001.
- EL FADILI, K. et al. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in Leishmania infantum axenic and intracellular amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1988-1993, 2005.
- EL FADILI, K. et al. Down regulation of KMP-11 in Leishmania infantum axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. **Exp. Parasitol.**, v. 123, n. 1, p. 51-7, set. 2009.
- EL FAKHRY, Y.; OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in Leishmania infantum. **Proteomics**, v. 2, n. 8, p. 1007-17, ago. 2002.
- EL-SAYED, N. M. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404-409, 2005.
- FLORENS, L. et al. A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 520-526, 2002.
- FOLGUEIRA, C.; REQUENA, J. M. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 31, n. 4, p. 359-77, jul. 2007.

FOUCHER, A. L.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of *Leishmania infantum*. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 7, p. 1741-1750, 2006.

FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 10, n. 2, p. 238-45, mar. 2010.

FREARSON, J. A. et al. Target assessment for anti-parasitic drug discovery. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 12, p. 589-595, 2007.

FREEDMAN, D. J.; BEVERLEY, S. M. Two more independent selectable markers for stable transfection of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 62, n. 1, p. 37-44, 1993.

GALAT, A.; BUA, J. Molecular aspects of cyclophilins mediating therapeutic actions of their ligands. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 67, n. 20, p. 3467-88, out. 2010.

GARCÍA-ESTRADA, C. et al. Identification of a gene in *Leishmania infantum* encoding a protein that contains a SP-RING/MIZ zinc finger domain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1629, n. 1-3, p. 44-52, 2003.

GASSER, J. Aspects of Chiral Dynamics. **hepph9711503**, n. November, p. 14, 1997.

GAZOLA, K. C. et al. Cell surface carbohydrates and in vivo infectivity of glucantime-sensitive and resistant *Leishmania* (*Viannia*) *guyjanensis* cell lines. **Parasitology Research**, v. 87, n. 11, p. 935-940, 2001.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. D. L. R. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 3, p. 86-88, 2002.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GONZALEZ, A. et al. Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 16, p. 5789-5804, 1985.

GOURBAL, B. et al. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31010-31017, 2004.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, n. 9, p. 564-573, 2002.

GUNDERSEN, G.; COOK, T. Microtubules and signal transduction. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 1999.

GUPTA, S. K. et al. Proteomic approach for identification and characterization of novel immunostimulatory proteins from soluble antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. **Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 816-23, mar. 2007.

HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, n. 6583, p. 571-579, fev. 1996.

HIDE, M. et al. *Leishmania infantum*: tuning digitonin fractionation for comparative proteomic of the mitochondrial protein content. **Parasitology research**, v. 103, n. 4, p. 989-92, set. 2008.

- IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005.
- JAYANARAYAN, K. G.; DEY, C. S. Resistance to arsenite modulates expression of beta- and gamma-tubulin and sensitivity to paclitaxel during differentiation of *Leishmania donovani*. **Parasitol. Res.**, v. 88, n. 8, p. 754-9, ago. 2002.
- JAYANARAYAN, K. G.; DEY, C. S. Altered expression, polymerisation and cellular distribution of alpha-/beta-tubulins and apoptosis-like cell death in arsenite resistant *Leishmania donovani* promastigotes. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, n. 8, p. 915-25, jul. 2004.
- KAPLER, G. M.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 3, p. 1084-1094, 1990.
- KELLY, J. M. et al. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 15, p. 3963-3969, 1992.
- KELLY, J. M. Trypanosomatid shuttle vectors: new tools for the functional dissection of parasite genomes. **Parasitology today Personal ed**, v. 11, n. 12, p. 447-451, 1995.
- KINDT, R. et al. Metabolomics to Unveil and Understand Phenotypic Diversity between Pathogen Populations. v. 4, n. 11, 2010.
- KUMAR, A.; SISODIA, B.; MISRA, P. Proteome mapping of overexpressed membrane-enriched and cytosolic proteins in sodium antimony gluconate (SAG) resistant clinical isolate of *Leishmania*. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 70, n. 4, p. 609-617, 2010.
- KUMARI, S. et al. Proteomic approaches for discovery of new targets for vaccine and therapeutics against visceral leishmaniasis. **Proteomics Clinical applications**, v. 2, n. 3, p. 372-386, 2008.
- KUMARI, S.; KUMAR, A.; SAMANT, M. Discovery of novel vaccine candidates and drug targets against visceral leishmaniasis using proteomics and transcriptomics. ... **Drug Targets**, v. 9, n. 11, p. 938-47, nov. 2008.
- LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 569-596, 1983.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, n. 5664, p. 595-600, 1978.
- LAMBERTI, A et al. The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: review article. **Amino Acids**, v. 26, n. 4, p. 443-8, jul. 2004.
- LARRETA, R. et al. The expression of HSP83 genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation. **BMC Mol. Biol.**, v. 5, p. 3, 3 jun. 2004.

- LASONDER, E. et al. Analysis of the Plasmodium falciparum proteome by high-accuracy mass spectrometry. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 537-542, 2002.
- LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Induction of heat shock and stress proteins promastigotes of three Leishmania species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, n. July, p. 4414-4417, 1985.
- LE FICHOUX, Y. et al. Short- and Long-Term Efficacy of Hexadecylphosphocholine against Established Leishmania infantum Infection in BALB/c Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 3, p. 654-658, 1998.
- LEBOWITZ, J. H. et al. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania. **Genes Development**, v. 7, n. 6, p. 996-1007, 1993.
- LIARTE, D. B.; MURTA, S. M. F. Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World Leishmania species. **Parasitol. Res.**, v. 107, n. 1, p. 205-12, jul. 2010.
- LIPOLDOVÁ, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 4, p. 294-305, 2006.
- LIRA, R. et al. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of Leishmania donovani. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, n. 2, p. 564-7, ago. 1999.
- LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.
- MANI, J. et al. Alba-domain proteins of Trypanosoma brucei are cytoplasmic RNA-binding proteins that interact with the translation machinery. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22463, jan. 2011.
- MANN, M.; KELLEHER, N. L. Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 47, p. 18132-18138, 2008.
- MARSDEN, P. D. et al. **High continuous antimony therapy in two patients with unresponsive mucosal leishmaniasis.** **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 1985.
- MBONGO, N. et al. Mechanism of amphotericin B resistance in Leishmania donovani promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 352-357, 1998.
- MCNICOLL, F. et al. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in Leishmania infantum. **Proteomics**, v. 6, n. 12, p. 3567-81, jun. 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed. Brasília-DF: [s.n.]. p. 120
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar americana**. 2. ed. Brasília-DF: [s.n.]. p. 182
- MIZOBUCHI, N. et al. ARMET is a soluble ER protein induced by the unfolded protein response via ERSE-II element. **Cell structure and function**, v. 32, n. 1, p. 41-50, jan. 2007.

- MODABBER, F. International Journal of Antimicrobial Agents Leishmaniasis vaccines : past , present and future. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. S58-S61, 2010.
- MORALES, M. A et al. Phosphoproteomic analysis of Leishmania donovani pro- and amastigote stages. **Proteomics**, v. 8, n. 2, p. 350-63, jan. 2008.
- MOREIRA, E. S.; ANACLETO, C.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L. Effect of glucantime on field and patient isolates of New World Leishmania: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. **Parasitology Research**, v. 84, n. 9, p. 720-726, 1998.
- MOREIRA, E. S.; SOARES, R. M.; PETRILLO-PEIXOTO, M. D. L. Glucantime susceptibility of Leishmania promastigotes under variable growth conditions. **Parasitology Research**, v. 81, n. 4, p. 291-295, 1995.
- MUHICH, M. L.; BOOTHROYD, J. C. Polycistronic transcripts in trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 8, n. 9, p. 3837-3846, 1988.
- MUKHOPADHYAY, D.; DASSO, M. Modification in reverse: the SUMO proteases. **Trends in biochemical sciences**, v. 32, n. 6, p. 286-95, jul. 2007.
- MUKHOPADHYAY, R. et al. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in Leishmania. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 19, p. 10383-7, 17 set. 1996.
- MURRAY, H.; FLANDERS, K. Antagonizing deactivating cytokines to enhance host defense and chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 7, p. 3903-3911, 2005.
- MURRAY, H. W. Treatment of visceral leishmaniasis in 2010: direction from Bihar State, India. **Future microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1301-3, out. 2010.
- NARE, B. et al. PTR1-dependent synthesis of tetrahydrobiopterin contributes to oxidant susceptibility in the trypanosomatid protozoan parasite Leishmania major. **Curr. Genet.**, v. 55, n. 3, p. 287-299, 2009.
- NARE, B.; HARDY, L. W.; BEVERLEY, S. M. The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase-thymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite Leishmania major. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 21, p. 13883-91, 23 maio. 1997.
- NATERA, S. et al. Leishmania spp.: proficiency of drug-resistant parasites. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, n. 6, p. 637-42, jun. 2007.
- NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255-262, 1988.
- NOGUEIRA, F. B. et al. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase in Trypanosoma cruzi populations susceptible and resistant to benznidazole. **Parasitol. Res.**, v. 104, n. 4, p. 835-44, mar. 2009.
- NUGENT, P. G. et al. Proteomic analysis of Leishmania mexicana differentiation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 136, n. 1, p. 51-62, jul. 2004.
- OBCHOEI, S.; WONGKHAN, S.; WONGKHAM, C. Cyclophilin A: potential functions and therapeutic target for human cancer. **Med. Sci. Monit.**, v. 15, n. 11, p. 221-232, 2009.

- OUELLETTE, M.; BORST, P. Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. **Research in Microbiology**, v. 142, n. 6, p. 737-746, 1991.
- OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist. Updat.**, v. 7, n. 4-5, p. 257-66, 2004.
- PAAPE, D. et al. Gel free analysis of the proteome of intracellular *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 169, n. 2, p. 108-114, 2010.
- 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**, v. 74, n. 9, p. 1614-1624, 19 maio. 2011.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, v. 26, n. 44, p. 1709–1724, 2008.
- PAPADOPOULOU, B. et al. Stage-specific regulation of gene expression in *Leishmania*. **Asm News**, v. 69, p. 282 -288, 2003.
- PEACOCK, C. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 7, p. 839-847, 2007.
- PESTOV, D. G. et al. Identification of species, strains and clones of *Leishmania* by characterization of kinetoplast DNA minicircles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 41, n. 2, p. 217-236, 1984.
- PINELLI, E.; SHAPIRA, M. Temperature-induced expression of proteins in *Leishmania mexicana amazonensis*. A 22-kDa protein is possibly localized in the mitochondrion. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 194, n. 2, p. 685-91, 12 dez. 1990.
- PONDER, E. L.; BOGYO, M. Ubiquitin-like modifiers and their deconjugating enzymes in medically important parasitic protozoa. **Eukaryot. Cell**, v. 6, n. 11, p. 1943-52, nov. 2007.
- PONTE-SUCRE, A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. **Kinetoplastid Biol. Dis.**, v. 2, n. 1, p. 14, 2003.
- PRASAD, V.; KUMAR, S. S.; DEY, C. S. Resistance to arsenite modulates levels of alpha-tubulin and sensitivity to paclitaxel in *Leishmania donovani*. **Parasitol. Res.**, v. 86, n. 10, p. 838-42, out. 2000.
- RAKOTOMANGA, M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P. M. Alteration of Fatty Acid and Sterol Metabolism in Miltefosine-Resistant *Leishmania donovani* Promastigotes and Consequences for Drug-Membrane Interactions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2677-2686, 2005.
- RAMÍREZ, J. L.; GUEVARA, P. Persistent infections by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 3, p. 333-8, 1997.
- RAYMOND, F. et al. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 3, p. 1131-47, fev. 2012.
- ROBERTS, W. L. et al. Characterization of the Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate Characterization of the Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime). v. 42, n. 5, 1998.

- ROGERS, M. B. et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of Leishmania. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2129-42, 2011.
- ROMERO, G. A. et al. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) braziliensis and L. (V.) guyanensis in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 5, p. 456-465, 2001.
- ROSENZWEIG, D. et al. Post-translational modification of cellular proteins during Leishmania donovani differentiation. **Proteomics**, v. 8, n. 9, p. 1843-50, maio. 2008.
- ROVIRA, P.; MASCARELL, L.; TRUFFA-BACHI, P. The impact of immunosuppressive drugs on the analysis of T cell activation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 673-692, 2000.
- SARAVIA, N. G. et al. Two-dimensional electrophoresis used to differentiate the causal agents of American tegumentary leishmaniasis. **Clinical Chemistry**, v. 30, n. 12 Pt 1, p. 2048-2052, 1984.
- SHAKED-MISHAN, P. et al. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in Leishmania donovani. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 6, p. 3971-6, 9 mar. 2001.
- SHAPIRA, M. & P. with a tandemly repeated genomic arrangement. **Exposure**, v. 236, p. 231 -236, 1989.
- SHARMA, S. et al. Proteomic analysis of wild type and arsenite-resistant Leishmania donovani. **Exp. Parasitol.**, v. 123, n. 4, p. 369-76, dez. 2009.
- SHYAM SUNDAR, 1 DEEPAK K. MORE, 1 MANOJ K. SINGH, 1; VIJAY P. SINGH, 1 SASHI SHARMA, 1 ANAND MAKHARIA, 1; PRASANNA C. K. KUMAR, 1 AND HENRY W. MURRAY. Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India : Report from the Center. v. 31, n. 2, p. 1104-1107, 2000.
- SILVA, E. S. et al. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte , State of Minas Gerais , Brazil. v. 96, n. April, p. 285-291, 2001.
- SILVERMAN, J. M. et al. Open Access Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani. 2008.
- SILVERMAN, J. M. et al. Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5011-5022, 2010.
- SMITH, D. F.; PEACOCK, C. S.; CRUZ, A. K. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniases. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 11, p. 1173-86, set. 2007.
- SOUSA, A. Q.; PEARSON, R. Drought, Smallpox, and Emergence of Leishmania braziliensis in Northeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 916-921, 2009.
- STEEN, H.; MANN, M. THE ABC ' S (AND XYZ ' S) OF PEPTIDE SEQUENCING. **Group**, v. 5, n. September, p. 699-711, 2004.
- SUNDAR, S. et al. **Treatment of antimony-unresponsive Indian visceral leishmaniasis with ultra-short courses of amphotericin-B-lipid complex.** *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. [s.l.] Carfax Publ Co, 1998.

- SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 6, n. 11, p. 849-54, dez. 2001.
- SUZUKI, J. et al. Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 98, n. 6, p. 811-817, 2006.
- TATE, E. W. Recent advances in chemical proteomics: exploring the post-translational proteome. **Journal of chemical biology**, v. 1, n. 1-4, p. 17-26, nov. 2008.
- THIEL, M.; BRUCHHAUS, I. Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 190, n. 1-2, p. 33-36, 2001.
- TULI, L.; RESSOM, H. W. LC-MS Based Detection of Differential Protein Expression. **Journal of proteomics bioinformatics**, v. 2, n. 10, p. 416-438, 2009.
- TURRENS, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Mol. Aspects Med.**, v. 25, n. 1-2, p. 211-220, 2004.
- VEITCH, N. J. et al. Transketolase from *Leishmania mexicana* has a dual subcellular localization. **The Biochemical journal**, v. 382, n. Pt 2, p. 759-767, 2004.
- VENUGOPAL, V. et al. Structure of cyclophilin from *Leishmania donovani* at 1.97 Å resolution. **Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications**, v. 63, n. Pt 2, p. 60-4, 1 fev. 2007.
- VERGNES, B. et al. 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, n. 1, p. 88-101, jan. 2007.
- WALKER, J. et al. Comparative protein profiling identifies elongation factor-1 β and trypanothione peroxidase as factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 145, n. 2, p. 254-64, fev. 2006.
- WALKER, J. et al. Discovery of factors linked to antimony resistance in *Leishmania panamensis* through differential proteome analysis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 183, n. 2, p. 166-76, jun. 2012.
- WALLNER, K. E.; DEGREGORIO, M. W.; LI, G. C. Hyperthermic potentiation of cis-diamminedichloroplatinum(II) cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells resistant to the drug. **Cancer Research**, v. 46, n. 12 Pt 1, p. 6242-6245, 1986.
- WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cadernos de saude publica Ministerio da Saude Fundacao Oswaldo Cruz Escola Nacional de Saude Publica**, v. 24, n. 12, p. 2937-2940, 2008.
- WHO. LEISHMANIASIS CONTROL IN EASTERN AFRICA : PAST AND PRESENT EFFORTS AND FUTURE NEEDS Situation and Gap Analysis. n. November, 2010.
- WILKINS, M. From Genome to Proteome : Looking at a Cell ' s Proteins. **October**, v. 270, n. 5235, p. 369-370, 1995.
- WINCKER, P. et al. A direct method for the chromosomal assignment of DNA markers in *Leishmania*. **Gene**, v. 194, n. 1, p. 77-80, 1997.

WYLLIE, S. et al. Elevated levels of trypanothione peroxidase in antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 173, n. 2, p. 162-4, out. 2010.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 38, p. 39925-32, 17 set. 2004.

YAU, W.-L. et al. Cyclosporin A treatment of *Leishmania donovani* reveals stage-specific functions of cyclophilins in parasite proliferation and viability. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 6, p. e729, jan. 2010.

ZHANG, W.-W.; MATLASHEWSKI, G. Screening *Leishmania donovani*-specific genes required for visceral infection. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 505-517, 2010.

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, n. 6, p. e248, jan. 2008.

ZHOU, Y. et al. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 36, p. 37445-51, 3 set. 2004.