

JOYCE SILVA SAAD

Identificação da variabilidade proteômica da forma promastigota da espécie *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, e *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, utilizando uma abordagem *shotgun proteomics*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

JOYCE SILVA SAAD

Identificação da variabilidade proteômica da forma promastigota da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, utilizando uma abordagem *shotgun proteomics*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Giuseppe Palmisano

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Joyce Silva Saad

Título da Dissertação/Tese: Identificação da variabilidade proteômica da forma promastigota da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, utilizando uma abordagem *shotgun proteomics*.

Orientador: Giuseppe Palmisano

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Silva Saad, Joyce

Identificação da variabilidade proteômica da forma promastigota da espécie *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, e *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, utilizando uma abordagem shotgun proteômica. / Joyce Silva Saad; orientador Giuseppe Palmisano; coorientador Mauro Cortez . -- São Paulo, 2019.

79 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Leishmania*. 2. Proteômica. 3. Espectrometria de Massas. I. Palmisano, Giuseppe, orientador. II. Cortez, Mauro, coorientador. III. Título.



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" - Buzantã - São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7793 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº 835/2016 referente ao projeto intitulado: ***"Identificação da variabilidade proteômica e suas modificações nas Leishmanias L. (V.) brazilienses, L. (L.) amazonensis e L. (L.) chagasi, utilizando uma abordagem Shotgun proteomics"*** sob a responsabilidade de **Joyce Silva Saad** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Giuseppe Palmisano**, do Departamento de Parasitologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 22 de novembro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Jesus Cristo por ter me direcionado a oportunidade de realizar o mestrado, ainda que uma pós-graduação não estivesse em meus planos.

Aos meus pais que deram apoio e incentivo permitindo que continuasse meus estudos, em especial a minha mãe que acompanhou todo o processo até a defesa e me ajudou tanto financeira quanto emocionalmente para eu continuasse.

Ao Prof. Giuseppe Palmisano pela grande oportunidade de trabalhar ao seu lado, sempre me incentivando, falando que eu podia mais, me permitindo descansar quando eu precisava, me apoiando nos concursos de karaokê, enfim, sendo muito mais que um orientador, e sim um amigo.

A todos os meus colegas do GPLab, Lívia, Cláudia, Simon, Gilberto e Daniel que contribuíram diretamente no meu processo de aprendizado e na execução do projeto. E um agradecimento especial a Rebeca que foi a primeira pessoa a me acolher no laboratório, que me ensinou o passo a passo da proteômica e glicoproteômica, que me incentivou a fazer o mestrado e que me recebeu em sua casa para que eu pudesse fazer o intercâmbio para a Austrália.

Agradeço também aos Laboratório do Prof. Dr. Mauro Cortez por ceder as espécies de *Leishmania* e especialmente a Ismael Sauter que me ensinou muito sobre a biologia do parasito, como preparar sua cultura e como realizar todos os ensaios biológicos descritos nesse estudo, ao Laboratório da Prof. Dra. Beatriz Stolf pelo auxílio e direcionamento de alguns tópicos deste estudo e ajuda nos ensaios de *western-blotting*, e ao Laboratório do Prof. Dr. Martin R. Larsen pelo processamento de amostras e uso do Espectrômetro de Massas.

As minhas amigas queridas do FourthHarmony que estão presentes na minha vida a mais de 10 anos e que apesar de tudo (estresse, cansaço, choros e alegrias) sempre pude contar com a ajuda delas.

Por fim agradeço aos colegas da faculdade de Ciências Farmacêuticas, Giulianna, Fabíola e Júlia que sempre me ajudaram com as atividades e provas do curso durante este difícil período. Sempre me lembrarei com carinho de cada uma de vocês, da faculdade nem tanto.

AGRADECIMENTO

Gostaria de agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2016/23689-2) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por seu apoio durante o período em que foi realizado este estudo. Apoio este que foi fundamental para sua realização, sem ele não teríamos alcançado os objetivos propostos.

O coração do sábio adquire o conhecimento, e o ouvido dos sábios procura o saber.

Pv. 18:15

RESUMO

SAAD, J. Identificação da variabilidade proteômica da forma promastigota da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e *Leishmania (Leishmania) chagasi*, utilizando uma abordagem *shotgun proteomics*. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A leishmaniose é um grupo de doenças negligenciadas causada por um parasito tripanossomatídeo pertencente ao gênero *Leishmania* e pode se manifestar de diferentes formas de acordo com a espécie infectante e a resposta imune do hospedeiro. A leishmaniose está classificada em tegumentar e visceral, podendo a tegumentar manifestar-se nas formas localizada, difusa, disseminada e mucocutânea. As análises filogenéticas revelam uma relação parental entre diferentes espécies de *Leishmania*, no entanto para muitas espécies, o estado filogenético ainda não foi resolvido. O estudo tem o objetivo de utilizar as técnicas proteômicas para comparar o proteoma da forma promastigota de três espécies de *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* identificando diferenças proteicas entre as fases exponencial e estacionária entre as espécies e dentro de uma mesma espécie e compará-las com a sua classificação filogenética, de modo a auxiliar a caracterização das diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Além disso, para mimetizar o evento destes parasitos quando transferidos do flebotominio para o hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo, uma parte dos parasitos foi incubada no 6º dia a 34° C por 24h. Como resultado identificamos um total de 6494, 3800 e 4155 para as condições exponencial, estacionária a 25°C e estacionária a 34°C respectivamente, tendo sempre maior quantidade de proteínas identificadas para *L. (V.) braziliensis*. Entre as condições analisadas a fase exponencial foi a que apresentou maior quantidade de proteínas identificadas, e também de proteínas únicas. Das proteínas encontradas reguladas destacam-se proteínas ribossômicas, proteínas de choque térmico, quinases e proteínas envolvidas em vias metabólicas. As espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* são as que mais apresentam diferenças entre si, enquanto *L. (L.) amazonensis* apresenta um perfil intermediário. As três espécies apresentam uma distinção entre a condição de desenvolvimento (exponencial) e estacionária como esperado, mas a novidade é ver diferenciação no proteoma entre as duas condições estacionárias para *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*, não sendo observado o mesmo para *L. (V.) braziliensis*. Os resultados comparativos entre a proteômica baseada em espectrometria de massas e *western blotting* apresentou diversidade de resultados demonstrando que a metodologia utilizada nesse

estudo vem a ser mais precisa na identificação de isoformas proteicas e pode oferecer uma complementariedade a essa técnica. Esse estudo mostra pela primeira vez a modulação de vias específicas na transição entre as fases de crescimento e a mudança de temperatura em *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, melhorando o conhecimento sobre as vias-chaves para a resposta do parasito ao ambiente.

Palavras-Chave: *Leishmania*, Modulação de Temperatura., Protômica, Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

SAAD, J. Identification of the proteomic variability of the promastigote form of the species *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *Leishmania (Leishmania) chagasi*, using shotgun proteomics approaches. Master thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Leishmaniasis is a group of neglected diseases caused by a trypanosomatid parasite belonging to the genus *Leishmania* and can manifest itself in different ways according to the infecting species and the immune response of the host. Leishmaniasis is classified as tegumentary and visceral, and the tegumentary can manifest itself in localized, diffuse, disseminated and mucocutaneous forms. Phylogenetic analyses have revealed a parental relationships between different species of *Leishmania*, however for many species, the phylogenetic state has not yet been solved. The objective of this study was to compare the promastigote proteome of three species of *Leishmania*: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*, identifying protein differences between the exponential and stationary phases between the species and within a same species and to compare them with their phylogenetic classification, in order to help the characterization of the different species of the genus *Leishmania*. In addition, to mimic the event of these parasites when transferred from the phlebotomine sandflies to the mammalian host during the blood repast, a part of the parasites were incubated on day 6 at 34° C for 24 h. As a result we identified a total of 6494, 3800 and 4155 for the exponential, stationary conditions at 25 ° C and stationary at 34°C respectively, A higher number of proteins was identified for *L. (V.) braziliensis*. Among the conditions analyzed, the exponential phase was the one with the highest amount of identified proteins classes, ribosomal proteins, heat shock proteins, kinases and proteins involved in metabolic pathways were highlighted. The *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) chagasi* species are the ones that present the most differences among them, while *L. (L.) amazonensis* presents an intermediate profile. The three species present a distinction between growth condition (exponential) and stationary as expected, but the novelty is to see differentiation in the proteome between the two stationary conditions for *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) chagasi*, not being observed the same for *L. (V.) braziliensis*. The comparative results between the proteomics based on mass spectrometry and western blot showed a diversity of results demonstrating that the methodology used in this study is more accurate in the identification of proteoforms and could be used as a complement for that technique. This study shows for the first time the

modulation of specific pathways in the transition between growth phases and temperature shift in *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) chagasi*, improving the knowledge about the key pathways for parasite response to the environment.

Keywords: *Leishmania*, Temperature Shift, Proteomics, Mass Espectrometry.

LISTA DE FIGURAS

1. Curva de crescimento da forma promastigota das três espécies ao longo de oito dias.
2. Fluxo de trabalho experimental para estudar a modulação do proteoma de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* em três condições diferentes.
3. Ensaio de viabilidade com iodeto de propídio.
4. Perfil proteômico através de SDS-PAGE 12% das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*
5. Quantidade de Proteínas identificadas em *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* nas condições exponencial e estacionária a 25°C e 34°C.
6. Comparação do perfil proteômico da fase exponencial entre as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*
7. Comparação do perfil proteômico da fase estacionária a 25° C entre as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*
8. Comparação do perfil proteômico da fase estacionária a 34° C entre as *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*
9. Comparação dois a dois de proteínas reguladas entre *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* utilizando *Volcano-test*.
10. Ontologia genética e expressão quantitativa por espécie nas 3 condições.
11. Análise comparativa das abundâncias de α -tubulina, GP63 e HSP70 por condições.
12. Proteínas α -tubulina, gp63 e HSP-70, identificadas e reguladas por condição em proteômica baseada em espectrometria de massas.
13. Atividade Proteolítica de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* nas condições exponencial (Expo), estacionária 25°C (25) e estacionária 34°C (34).
14. Comparação do perfil proteômico em *L. (L.) amazonensis* nas condições exponencial, estacionária a 25°C e estacionária a 34°C.
15. Comparação do perfil proteômico em *L. (V.) braziliensis* nas condições exponencial, estacionária a 25°C e estacionária a 34°C.
16. Comparação do perfil proteômico em *L. (L.) chagasi* nas condições exponencial, estacionária a 25°C e estacionária a 34°C.
17. Comparação de proteínas totais identificadas e reguladas em *Leishmania* e ontologia gênica em fases de crescimento e mudança de temperatura.
18. Análise comparativa das abundâncias de α -tubulina, GP63 e HSP70 por espécie.
19. Proteínas α -tubulina, gp63 e HSP-70, identificadas e reguladas por espécie em proteômica baseada em espectrometria de massas.

20. Viabilidade de promastigotas em fase estacionária de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* em diferentes temperaturas após 24 h.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BDO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
BSA	Albumina sérica bovina
C18	Cadeia de Carbono Octadecil (<i>Octadecyl Carbon Chain</i>)
DNase	Desoxirribonuclease
DTT	Ditiotreitol
FDR	Taxa de Detecção Falsa
GP63	Glicoproteína 63
HCD	Dissociação Induzida por Alta Energia de Colisão (<i>High Energy Collision dissociation</i>)
HSP	Proteínas de Choque Térmico (<i>Heat Shock Proteín</i>)
La	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>
Lb	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>
Lc	<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LFQ	Quantificação Livre de Marcador (<i>Label Free Quantification</i>)
LV	Leishmaniose visceral
mRNA	RNA mensageiro
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil- 2-thiazolil]-2,5-difenil- 2H-tetrazólio
MALDI-TOF	Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz por Tempo de Vôo (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i>)
nLC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (<i>nano-Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de Massas Sequencial (<i>Tandem-Mass Spetrometry</i>)
N-terminal	Amino Terminal
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RT-qPCR	PCR em tempo Real (<i>Quantitative Real-Time PCR</i>)

SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
XIC	Cromatograma de Íon Extraído (<i>Extracted Ion Chromatogram</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Leishmaniose	19
1.2 A <i>Leishmania</i> e suas classificações	21
1.3 Fatores que auxiliam o parasito no sucesso da infecção: gp63 e a proteínas de choque térmico.	24
1.4 A Proteômica	26
1.5 A Proteômica em <i>Leishmania</i>	28
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Cultura de Promastigotas de <i>Leishmania</i>	31
3.2 Ensaio de viabilidade e morte celular	33
3.3 Extração e digestão de proteínas	33
3.4 Análise por espectrometria de massas (MS/MS)	34
3.5 Busca em banco de dados e análise bioinformática.	34
3.6 Ensaio de Termotolerância	35
3.7 PCR quantitativo em tempo Real	35
3.8 SDS-Page e <i>Western-blotting</i>	36

4. RESULTADOS	37
4.1 Análise proteômica comparativa das espécies de <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L. (L.) chagasi</i>	37
4.2 Modulação de proteínas de <i>Leishmania</i> durante a transição da fase de crescimento e mudança de temperatura.	49
4.3 Proteínas de Choque Térmico (HSPs)	55
5. DISCUSSÃO	57
5.1 Tubulina	62
5.2 GP63.....	63
5.3 HSPs.....	64
6. CONCLUSÃO	67
7. REFERÊNCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é um grupo de doenças negligenciadas causadas por um parasito tripanossomatídeo pertencente ao gênero *Leishmania*, que afeta principalmente as regiões mais pobres do mundo (Pace, 2014; Real *et al.*, 2013). A leishmaniose pode se manifestar de diferentes formas de acordo com a espécie infectante e a resposta imune do hospedeiro podendo variar desde assintomática à duas principais síndromes: leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral (LV) (Akilov *et al.*, 2007; Pace, 2014; WHO, 2019).

A Leishmaniose tegumentar apresenta diferentes formas de acordo com as manifestações clínicas apresentadas pelo hospedeiro. A leishmaniose cutânea localizada (LCL) apresenta lesões ulcerativas no local da picada e pode ser auto curável. A leishmaniose cutânea difusa (LCD) se manifesta de modo mais severa, causando o aparecimento de múltiplos nódulos não ulcerativos. Já a forma disseminada da leishmaniose cutânea é caracterizada por múltiplas lesões ulceradas e papulares encontradas em diversas áreas do corpo, devido a disseminação por meio da via hematogênica ou linfática (Macgwire e Satoskar, 2014). Em alguns casos de infecções por espécies como a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, há o desenvolvimento da forma mucocutânea da doença. Apesar de poder ocorrer simultaneamente com uma manifestação cutânea, geralmente desenvolve-se meses ou anos após a LC. Esta forma da doença atinge as mucosas do trato respiratório superior, afetando a cavidade nasal e muitas vezes também a cavidade oral (Goto e Lindoso, 2012). A leishmaniose mucocutânea tem a capacidade de destruir os tecidos, causando desfiguração e até mesmo a morte do paciente por infecções secundárias (Goto e Lindoso, 2012; Macgwire e Satoskar, 2014). No Brasil a principal espécie causadora de leishmaniose cutânea é a *Leishmania (V.) braziliensis*, seguida pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Pace, 2014).

A LV (ou *kalazar*) ocorre devido à metástase das células infectadas do local da picada do flebotomíneo aos órgãos viscerais como baço, fígado e medula óssea. Devido à grande atividade de defesa imunológica do organismo, a infecção provoca um quadro de hepatoesplenomegalia - aumento do tamanho do baço e do fígado - assim como um quadro de trombocitopenia e anemia, devido a supressão da medula. Esta forma da doença, se não tratada devidamente leva à morte do paciente (Macgwire e Satoskar, 2014). Alguns casos de leishmaniose visceral podem apresentar complicações posteriores. A leishmaniose dérmica pós-kalazar (LDPK) ocorre em pacientes clinicamente curados da leishmaniose visceral,

podendo surgir até 20 anos após a infecção inicial. Neste caso o paciente apresenta lesões nodulares, maculares ou papulares com desenvolvimento progressivo (Macgwire e Satoskar, 2014). No Brasil a principal espécie causadora de leishmaniose visceral é a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Alvar *et al.*, 2012).

A leishmaniose está presente em mais 98 países (Moreno e Alvar, 2002), sendo encontrada em áreas tropicais e subtropicais, incluindo América do Norte, Central e do Sul, Bacia do Mediterrâneo, Sudeste da Europa, Oriente Médio, Ásia Central e Sudeste, Subcontinente indiano, África, e recentemente foi identificada também na Austrália (Akhoundi *et al.*, 2016). É a segunda parasitose mais comum perdendo apenas para a malária, causando de 20.000 a 30.000 mortes anualmente (Kevric *et al.*, 2015), sendo de 0,2 a 0,4 milhão os casos de leishmaniose visceral e de 0,7 a 1,2 milhão os casos de leishmaniose tegumentar (Alvar *et al.*, 2012).

O aumento de indivíduos imunossuprimidos, infecções secundárias como o HIV, agentes quimioterápicos, terapias biológicas introduzidas no tratamento de inflamações crônicas na Europa (Alvar *et al.*, 2012; Ready, 2010) e o aumento de estrangeiros em regiões endêmicas vêm contribuindo para o aumento dos casos de leishmaniose em países não endêmicos (Field *et al.*, 2010).

O diagnóstico da doença da leishmaniose baseia-se na apresentação clínica: cultivo *in vitro*, exame parasitológico de parasitos em esfregaços ou aspirados de biópsia, detecção molecular de ácidos nucleicos parasitários e detecção sorológica de antígenos parasitários ou anticorpos antiparasitários em circulação (Singh, 2006; Chappuis *et al.*, 2007). O diagnóstico clínico é complicado e carece de especificidade devido ao amplo espectro clínico da leishmaniose e doenças intimamente relacionadas, que geralmente coexistem em regiões endêmicas. O exame parasitológico de parasitos continua sendo o diagnóstico confirmatório de leishmaniose devido a sua alta especificidade. No entanto, nos casos de baixa parasitemia, a sensibilidade é limitada, sendo necessário o uso de diagnóstico molecular com maior sensibilidade (Reithinger e Dujardin, 2007).

A *Leishmania* é transmitida quando um flebotómio fêmea infectado realiza o repasto sanguíneo transmitindo as formas promastigotas metacíclicas para o local da picada no hospedeiro. Essa forma móvel e flagelada é fagocitada por células do sistema imunológico, como os macrófagos. Dentro destas células a forma promastigota metacíclica transforma-se em amastigota. Essa sofre divisão binária, multiplicando-se e infectando outras células. Durante o repasto sanguíneo de um flebotómio não infectado, este pode ingerir células contendo

amastigotas ou mesmo amastigotas livres no local da picada. Dentro do intestino do inseto, os amastigotas irão se transformar nas formas promastigotas procíclicas. Após se multiplicarem, estas formas migram para a probólide do flebotomíneo e sofrem metaciclogênese, se diferenciando nas formas infectivas metacíclicas, que serão transmitidas em um novo repasto sanguíneo (Kevric *et al.*, 2015).

Os flebotomíneos transmissores da leishmaniose pertencem à Ordem Diptera, Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae. São reconhecidos seis gêneros de flebotomíneos, sendo de interesse para a entomologia médica os gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (Killick-Kendrick, 1999). Há mais de 500 espécies conhecidas, mas somente cerca de 30 transmitem o parasito (WHO, 2019). A sobrevivência do parasito depende do sucesso da transmissão entre o vetor e o hospedeiro, nesse caso um mamífero. A transmissão ocorre em ciclos domésticos e peridomésticos, no qual o cão, gatos, equinos e para algumas espécies o próprio ser humano são os principais hospedeiros, ou em ciclos silvestres onde a transmissão ocorre entre animais selvagens, raposas e roedores. A transmissão do parasito ocorre desde cidades até desertos e florestas tropicais em todos os continentes, exceto na Antártica (Bern *et al.*, 2008).

1.2 A *Leishmania* e suas classificações

A *Leishmania* é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania*, *Paraleishmania* e complexo *L. enriettii*. Por meio da análise de isoenzimas também foram definidos complexos de espécies: *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) major*, *L. Leishmania (Leishmania) atethiopica*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*) dentro dos subgêneros (Rioux *et al.*, 1990; Bañuls *et al.*, 2007; Kevric *et al.*, 2015). Atualmente são conhecidas aproximadamente 53 espécies, variando entre países endêmicos. Destas, 31 espécies são conhecidas como parasitos de mamíferos e 20 espécies são patogênicas para os seres humanos (Akhoundi *et al.*, 2016).

A classificação inicial de *Leishmania* foi sugerida por Nicolle em 1908, que separou *Leishmania (Leishmania.) infantum*, o agente etiológico da leishmaniose visceral no Mediterrâneo, da *Leishmania. (Leishmania.) donovani*, o agente causador do *kalazar* indiano. Em seguida, Biagi propôs a separação de várias espécies de *Leishmania* do Novo Mundo (Biagi,

1953). Em 1964 (Adler, 1964), Adler discutiu as dificuldades em aceitar uma taxonomia baseada na clínica, uma vez que a leishmaniose pode demonstrar os mesmos sintomas clínicos, sendo transmitida por duas espécies diferentes de *Leishmania*, por exemplo, leishmaniose visceral com sintomas cutâneos. Outra tentativa para classificar a *Leishmania* que parasita mamíferos utilizando a maneira tradicional (nomeando e definindo espécies e subespécies) foi apresentada por Lainson e Shaw (Lainson e Shaw, 1972, 1974) e Bray e colaboradores (Bray *et al.*, 1973). Em 1979 (LAINSON *et al.*, 1979) Lainson e colaboradores descreveram três seções de *Leishmania*, de acordo com o desenvolvimento intravetorial do parasito: hipopilaria (com desenvolvimento no intestino posterior), peripylaria (desenvolvimento no intestino posterior e no piloro) e Suprapylaria (desenvolvimento anterior ao piloro).

Em 1982 (Saf'Janova, 1982), o pesquisador russo Saf'janova propôs a separação da *Leishmania* que infecta lagartos da *Leishmania* que infecta mamíferos, propondo a ela o nome de *Sauroleishmania* (Ranque, 1973). Dessa forma criou-se um gênero separado chamado de *Sauroleishmania* por Killick-Kendrick e colaboradores (Killick-Kendrick *et al.*, 1986) e as outras espécies formaram um gênero separado.

Em 1987, novamente Lainson e Shaw apresentaram dois subgêneros para as espécies de *Leishmania*: *Leishmania* com desenvolvimento no intestino anterior (Suprapilaria) e *Viannia* com desenvolvimento no intestino posterior e piloro (Peripilaria). O subgênero *Viannia* é restrito ao Novo Mundo, enquanto o subgênero *Leishmania* ocorre tanto no Novo como no Velho Mundo (Lainson e Shaw, 1987).

Posteriormente as análises filogenéticas revelaram uma relação parental entre diferentes espécies de *Leishmania*. A classificação fenética e, especialmente, a cladística, confirmou a maioria dos grupos taxonômicos previamente estabelecidos por Lainson e Shaw (Lainson e Shaw, 1987). As classificações fenéticas pioneiras baseadas em isoenzimas foram propostas por Moreno e colaboradores (Moreno *et al.*, 1986), Thomas-Soccol e colaboradores (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993), e Cupolillo e colaboradores (Cupolillo *et al.*, 1994) para o Novo Mundo e por Lanotte e colaboradores (Lanotte *et al.*, 1981), Le Blanq e colaboradores (Le Blanq *et al.*, 1986) para o Velho Mundo.

Rioux e colaboradores (Rioux *et al.*, 1990) combinaram todos os táxons do Novo e do Velho Mundo em um sistema de classificação. A concordância entre essas classificações foi mutuamente validada tanto extrínseca (geografia, distribuição, forma clínica e características de desenvolvimento no intestino do flebotomíneo) e critérios intrínsecos (bioquímicos, imunológicos e marcadores moleculares).

Recentemente uma nova classificação para *Leishmania* foi proposta baseada em dados moleculares, que dividem as espécies de *Leishmania* em duas linhagens filogenéticas principais Euleishmania e Paraleishmania (Cupolillo *et al.*, 2000). A seção Euleishmania compreende quatro subgêneros: *Leishmania* (ex: *L. (L.) donovani*), *Viannia* (ex: *L. (V.) braziliensis*), *Sauroleishmania* (ex: *Leishmania tarentolae*) e complexo *Leishmania. enriettii* (ex: *Leishmania. enriettii*). A seção Paraleishmania inclui *Leishmania. hertigi*, *Leishmania. deanei*, *Leishmania. herreri*, *Leishmania. equatorensis* e *Leishmania. colombiensis*. Desse grupo, apenas *Leishmania. colombiensis* foi encontrado patogênico para os seres humanos.

Para muitas espécies, o estado filogenético ainda não foi resolvido (espécies ou subespécies ou mesmo sinônimos), principalmente devido ao número limitado de isolados incluídos, por exemplo, *Leishmania. amazonensis*, *Leishmania. garnhami*, *Leishmania. pifanoi*, *Leishmania. venezuelensis*, *Leishmania. aristidesi*, *Leishmania. forattinii*, *Leishmania. arabica*, *Leishmania. utingensis* (representada por uma única amostra), *Leishmania. lindenbergi*, *Leishmania. enrietti* e aqueles pertencentes à seção Paraleishmania. Além disso, dados moleculares baseados na proteína de choque térmico 70 (*HSP70*, do inglês *Heat Shock Protein 70*) (Fraga *et al.*, 2010) provaram a existência de apenas nove grupos monofiléticos. Esses grupos podem representar espécies distintas e outras que devem ser tratadas como subespécies destes grupos como por exemplo *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica* (Schönian *et al.*, 2010). No entanto, nem todas as espécies conhecidas foram incluídas nesses estudos, especialmente para o complexo *L. mexicana*.

Os dados moleculares baseados na Tipagem de Microssatélites Multilocus (MLMT, do inglês *Multilocus Microsatellite Typing*) não apoiam os complexos de espécies apresentados por Lainson e Shaw (Lainson e Shaw, 1987; Schönian *et al.*, 2010), e por isso a sua classificação deve ser revisada. O sequenciamento completo de todo o genoma de muitas espécies, a análise de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) e a análise por Tipagem de Sequências de Multilocus (MLST, do inglês *Multilocus Sequence Typing*) e MLMT, com uma amostragem adequada e inclusão de representantes de todas as espécies (com número suficiente de isolados de diferentes áreas de distribuição) contribuirão para a melhoria da classificação do gênero *Leishmania* (Akhoundi *et al.*, 2016). Além de análises genéticas (DNA), o conhecimento de outras biomoléculas como proteínas, utilizando técnicas proteômicas, também podem auxiliar a caracterização das diferentes espécies do

gênero *Leishmania*.

1.3 Fatores que auxiliam o parasito no sucesso da infecção: gp63 e a proteínas de choque térmico.

Como muitos parasitos, a *Leishmania* necessita de moléculas específicas que o ajudem a sobreviver dentro do Flebotomíneo e seu hospedeiro. Essas moléculas desempenham papéis vitais na sobrevivência, infectividade, virulência e estabelecimento da doença pelos parasitos (Olivier *et al.*, 2012). Aqui citaremos duas delas, a gp63 e as proteínas de choque térmico (HSPs).

A gp63, conhecida como metaloprotease de zinco 63 ou leishmanolisina é um antígeno de superfície que protege o parasito contra vários componentes do sistema imune do hospedeiro durante seus estágios iniciais de infecção (Olivier *et al.*, 2012) permitindo um não desencadeamento da resposta imune inata. Está presente nas formas promastigotas e amastigotas (Chaudhuri *et al.*, 1989) evitando a lise do parasito pelo sistema complemento (Brittingham *et al.*, 1995) auxilia o parasito na aderência aos macrófagos (McGwire *et al.*, 2003) e degrada a matriz extracelular favorecendo sua migração (Olivier *et al.*, 2012).

Alguns estudos já demonstraram um grande número de genes para gp63 o que gera um número abundante dessas proteínas que podem variar entre espécies e fases da vida de *Leishmania* produzindo diversos efeitos biológicos (Isnard *et al.*, 2012). Embora não tão estudada como o próximo fator de virulência do qual falaremos em seguida, aos longo dos anos estudos acumularam evidências de que a gp63 pode ser um dos principais fator de virulência entre as espécies de *Leishmania* (Chaudhuri *et al.*, 1989).

O segundo fator que abordaremos é a influência da temperatura na sobrevivência desses parasitos. Dentro do flebotomíneo, os parasitos permanecem em temperaturas entre 22-28 °C, no entanto ao serem transferidos para o hospedeiro mamífero são expostas a temperaturas entre 33°C e 37 °C (Zilberstein e Shapira, 1994) sendo que cada espécie possui temperaturas diferentes e perfeitas para o seu desenvolvimento. (Callahan *et al.*, 1996). Essa mudança brusca de temperatura poderia causar dano as membranas e proteínas do parasito, no entanto elas conseguem sobreviver em seus hospedeiros, pois adquiriram sistemas termolerantes (Zilberstein e Shapira, 1994).

A temperatura dos flebotomínios também tem demonstrado afetar a adaptação de diferentes espécies de *Leishmania* (Hlavacova *et al.*, 2013). Por exemplo, a *L.peruviana* infectou bem flebotomínios a 20 °C, mas não a 26 °C, enquanto *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.)*

infantum puderam se adaptar às duas temperaturas. Juntos, esses estudos mostram uma importância crucial das proteínas de choque térmico e sua resposta na biologia da *Leishmania*.

As espécies cutâneas e viscerais do Velho Mundo não apresentam diferenças significativas em seu desenvolvimento, multiplicando-se bem em temperaturas entre 30°C e 32°C, entretanto para espécies do Novo Mundo, espécies viscerais como *L. (L.) chagasi* desenvolvem-se melhor que *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, em 30°C. Destes, a mais resistente é *L. (L.) mexicana*, seguido de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (Callahan *et al.*, 1996). *L. (L.) major*, por exemplo, multiplica mais rapidamente em macrófagos a 35°C que 37°C e são eliminadas a 39°C, já a *L. (L.) mexicana* prolifera melhor a 34°C em macrófagos e a 37,5°C são eliminadas (Biegel *et al.*, 1983). Um estudo *in vivo* com *L. (V.) braziliensis* identificou que os tamanhos das lesões aumentavam quando expostas a temperatura de mamíferos (Smejkal *et al.*, 1988) e que o tratamento térmico em *L. (L.) donovani*, também o protegia contra estresse oxidativo com H₂O₂ (Zarley *et al.*, 1991). Entre as proteínas envolvidas na resistência a altas temperaturas estão as proteínas de choque térmico. Estas proteínas são sintetizadas, aumentando sua expressão, em alguns casos, durante a diferenciação de promastigotas em amastigotas (Hunter *et al.*, 1984). Proteínas de choque térmico expressas em *Leishmania* exposta a uma ampla faixa de temperaturas sugerem que as HSPs desempenham um papel na diferenciação e sobrevivência do hospedeiro (Teixeira *et al.*, 2015). Elas possuem como função dobramento, montagem, localização intracelular, secreção, regulação e degradação de outras proteínas (Young *et al.*, 2004).

A indução de genes específicos após choque térmico em *Leishmania* é conhecida desde 1984 (Hunter *et al.*, 1984). De fato, após mudança de temperatura durante a diferenciação de promastigota em amastigota em estudo realizado com *L. (L.) mexicana* identificou-se sete proteínas sintetizadas ativamente. Essas proteínas corresponderam exatamente ao peso molecular das bem conhecidas proteínas de choque térmico observadas em espécies como *Drosophila*. Curiosamente, a regulação desses genes foi pós-transcricional, uma vez que a densidade da polimerase não sofreu alteração após a mudança de temperatura (Hunter *et al.*, 1984; Argaman *et al.*, 1994). As modificações ambientais sofridas pelo parasito, aumento de temperatura e pH, quando este passa do vetor ao hospedeiro permitem a sua conversão de promastigota para amastigota facilitando a sobrevivência do parasito no hospedeiro (Lawrence e Robert-Gero, 1985; Hunter *et al.*, 1984; Shapira *et al.*, 1988).

A indução de proteínas específicas de *Leishmania* após a mudança de temperatura já foi relatada. Foi demonstrado que a mudança de temperatura de 26 °C para 37 °C nas culturas de

L. (L.) tropica, *L. enrietti* e *L. (L.) donovani* induziu a expressão de três proteínas com peso molecular aparente de 88, 74 e 54 kDa. Curiosamente, a adição de actinomicina C1, um inibidor da transcrição, antes da mudança de temperatura inibiu a síntese dessas proteínas, mostrando uma síntese de proteína dependente da temperatura (Lawrence e Robert-Gero, 1985). As proteínas de choque térmico expressas em *Leishmania* expostas a uma ampla gama de temperaturas sugerem que as *HSPs* desempenham um papel na diferenciação e sobrevivência ao hospedeiro. De fato, em algumas espécies de *Leishmania*, um aumento na temperatura pode induzir a diferenciação em formas semelhantes ao amastigota axênico. Teixeira et al. analisaram o efeito da resposta imune do hospedeiro no proteoma de *Leishmania*. Em particular, os proteomas de amastigotas isolados de BALB/c e BALB/c nude revelaram 44 proteínas diferencialmente expressas sendo a *HSP70* uma delas (Teixeira et al., 2015). Uma isoforma da *HSP70* aumentou em amastigotas isolados de BALB/c em comparação com camundongos imunodeficientes. Outro estudo mostrou que a *HSP83* aumenta em resposta ao choque térmico nas horas iniciais de diferenciação de promastigota em amastigota em *L. (L.) infantum* (Larreta et al., 2004). Vários estudos foram dedicados a estudar *HSPs* na diferenciação, proliferação e sobrevivência de *Leishmania* no hospedeiro. No entanto, poucos estudos são relatados para as pequenas proteínas de choque térmico, como *HSP23*. O que se tem conhecimento é que os mutantes knockout *HSP23* não são infecciosos para macrófagos *in vitro* e são mais sensíveis a drogas e temperaturas aumentadas (Homback et al., 2014).

1.4 A Proteômica

A proteômica estuda o conjunto de proteínas que diretamente ou indiretamente são responsáveis por quase todos os processos biológicos (Valledor e Jorin, 2011). Ela caracteriza em larga escala as proteínas em uma linhagem celular, tecido ou organismo, em um determinado tempo e espaço com o objetivo de acessar um sistema geral com visão integrada dos processos biológicos (Banerjee e Mazumdar, 2012; Aebersold e Mann, 2016) estudando todo um conjunto de proteínas expressas em vez de proteínas individuais (Mann, 2016). O uso de ferramentas proteômicas revolucionou vários campos biomédicos, como medicina e odontologia, ajudando na identificação de diferentes biomarcadores para o diagnóstico precoce de várias doenças (Kohn et al., 2007; Geyer et al., 2017) além da identificação e caracterização de vias, tanto do parasito quanto do hospedeiro (Greco e Cristea, 2017; Venkatesh et al., 2018) Abordagens de proteômica tem impulsionado a quantificação de proteínas, interações e modificações pós-traducionais em sistemas biológicos complexos (Banerjee e Mazumdar, 2012; Aebersold e

Mann, 2016). Na última década, técnicas “high-throughput” que podem processar e analisar grandes quantidades de moléculas usando sistemas automatizados em um curto espaço de tempo, nos permitiram identificar moléculas envolvidas no estabelecimento de doenças causadas por parasitos, desenvolvimento de resistência parasitária (List *et al.*, 2008), e a caracterização de novos alvos quimioterapêuticos (Soong *et al.*, 1997; Soong, 2012).

Como ferramenta central da proteômica temos a espectrometria de massas (MS). Ela é muito utilizada quando há necessidade de se produzir mapas proteômicos e permite o processamento de centenas de amostras em uma única análise (Pennington e Dunn, 2001; Aebersold e Mann, 2003; Walther e Mann, 2010).

As metodologias aplicadas a proteômica são de dois tipos: *bottom-up* e *top-down*. O *bottom-up*, é um processo no qual as proteínas, após serem digeridas com tripsina, são analisadas por espectrometria de massas (MS). Esse método apresenta vantagens como a sensibilidade e reprodutibilidade, mesmo para proteomas complexos como de soro e lisados celulares. No entanto as respostas obtidas são fragmentos de um todo e, embora seja possível a identificação de uma proteína com base em alguns peptídeos as combinações das modificações pós-traducionais podem ser perdidas (Chait, 2006; Nesatyy e Suter, 2008; Toby *et al.*, 2016). A abordagem *top-down* permite a análise de proteínas intactas sem necessidade de tratamento com enzimas. A vantagem dessa técnica é a identificação direta das proteínas e a desvantagem é a diversidade físico-química das proteínas como solubilidade, hidrofobicidade e tamanho entre outras que dificultam a análise por espectrometria de massas de todo o conjunto proteico de um organismo (Catherman *et al.*, 2014).

No momento, a proteômica está sendo utilizada para diagnosticar e analisar amostras que possam ter alterações no padrão de expressão proteica associadas a uma doença. Essa metodologia fornece uma abordagem confiável para resolução de problemas relacionados com a identificação e diferenciação de espécies de microrganismos. (Sedo *et al.*, 2011; Martiny *et al.*, 2014), além de permitir uma identificação rápida, precisa e barata de microrganismos de culturas e amostras biológicas em relação a métodos convencionais de identificação, como os moleculares (Seng *et al.*, 2010; Cassagne *et al.*, 2014), que são complicados e caros (Clarck *et al.*, 2013).

A *Leishmania* regula sua expressão gênica nos níveis pós-transcricional e pós-traducional, dificultando encontrar uma relação entre seu transcriptoma e a funcionalidade das proteínas. Dessa forma para apoiar estudos de sequenciamento genômico, a proteômica tem sido utilizada para criar mapas de proteínas de *Leishmania* (De Jesus *et al.*, 2014).

1.5 A Proteômica em *Leishmania*

Recentemente, alguns estudos têm relatado o uso da espectrometria de massas para a identificação de várias espécies de *Leishmania* a partir de culturas *in vitro* (Cassagne *et al.*, 2014; Culha *et al.*, 2014; Mouri *et al.*, 2014). No estudo de Mouri e colaboradores em 2014, a análise da impressão digital de massas peptídicas (PMF) de cada amostra revelou que as amostras isoladas puderam ser identificadas nos subgêneros *Viannia* ou *Leishmania*, e também nas espécies baseando-se na presença/ausência de picos exclusivos. Em outro estudo, Kumar e colaboradores em 2015, analisaram o subproteoma de uma fração enriquecida de proteínas de membrana (MEP) da forma promastigota de *L. (L.) donovani*. Nesse estudo identificou-se 95 spots de proteínas de MEP através de eletroforese em gel bidimensional (2-D) e em conjunto com MALDI-TOF MS identificou várias proteínas funcionais relevantes. Dos 95 spots, 72 foram identificados e classificados com base em sua função biológica. Também foram identificadas várias proteínas desconhecidas pertencentes a diferentes classes como sinalização celular, receptores transmembranares, transportadores e proteínas resistentes a múltiplas drogas (Kumar *et al.*, 2015). Em 2013, Tsigankov e colaboradores, estudaram a influência entre a fosforilação de proteínas e os processos de regulação das fases amastigota e promastigota de *L. (L.) donovani*.

A análise em shotgun revelou 1614 sítios de fosforilação correspondente a 627 proteínas sendo que a maioria dos sítios de fosforilação são específicos para cada fase. No estudo realizado por Lima e colaboradores em 2016 utilizou-se uma abordagem proteômica identificando as proteínas mais abundantes e imunogênicas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*. Das 16 proteínas encontradas, 9 são derivadas de espécies causadoras de leishmaniose tegumentar (*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*), sendo que duas proteínas reagiram exclusivamente com o soro de pacientes com a doença, apresentando muitos epítomos de células B sem similaridade com *Trypanosoma cruzi*. Essas proteínas podem ser boas candidatas para melhorar a especificidade e sensibilidade dos testes sorológicos com o objetivo de diagnosticar a leishmaniose tegumentar. Dessa forma, a identificação de proteínas altamente imunogênicas e abundantes que estimulam a resposta imune humoral no hospedeiro devem ajudar no desenvolvimento de testes sorológicos para leishmaniose tegumentar em humanos (Lima e Pires, *et al.*, 2016). O estudo do proteoma também foi utilizado para entender como a resposta imune do hospedeiro afeta o fenótipo da *Leishmania* e sua virulência. Nesse estudo foram comparados proteomas de amastigotas isolados de BALB/c e BALB/c nude

chegando a 44 spots diferencialmente expressos. Esses spots estavam relacionados à estresse oxidativo e nitrosativo bem como algumas proteases e fatores de virulência como OPB e tryparedoxina peroxidase (Teixeira *et al.*, 2015). A partir desses estudos vemos que a proteômica deve ser considerada como uma ferramenta de grande importância para entender melhor as interações hospedeiro-*Leishmania*.

O nosso estudo apresenta pela primeira vez a comparação do proteoma de três espécies de *Leishmania* (*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*) endêmicas no Brasil e de grande importância médica. Nesse estudo foram comparadas três condições por cada espécie (exponencial, estacionária a 25°C e estacionária a 34°C) para identificar as proteínas chaves na adaptação ao ambiente/hospedeiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o proteoma da forma promastigota das espécies de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) brasiliensis* e *L. (L.) chagasi* utilizando uma abordagem *shotgun* a fim de correlacionar seus proteomas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Analisar por espectrometria de massa e bioinformática as proteínas de promastigotas das três diferentes espécies do Novo Mundo de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) brasiliensis* e *L. (L.) chagasi*;
2. Determinar proteínas diferentemente expressas entre as espécies e em três diferentes condições (exponencial, estacionária a 25°C e estacionária a 34°C);
3. Correlacionar as classes específicas de proteínas, α -tubulina, gp63 e proteínas de choque térmico, com a resposta ao estresse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de Promastigotas de *Leishmania*

L. (L.) amazonensis (IFLA/BR/67/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivadas sob a forma promastigota em meio M199 (Vitrocell), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cultilab) e 2% de urina. As culturas de cada espécie foram mantidas em garrafas de 25 cm² contendo 5 mL de meio a 25 °C, em estufa para demanda bioquímica de oxigênio (BOD). No 7º dia de cada uma das culturas foi feito o repique com um número inicial de 5 x 10⁵ promastigotas por garrafa. Curvas de crescimento foram feitas para acompanhar a multiplicação dos parasitos e definir sua fase estacionária.

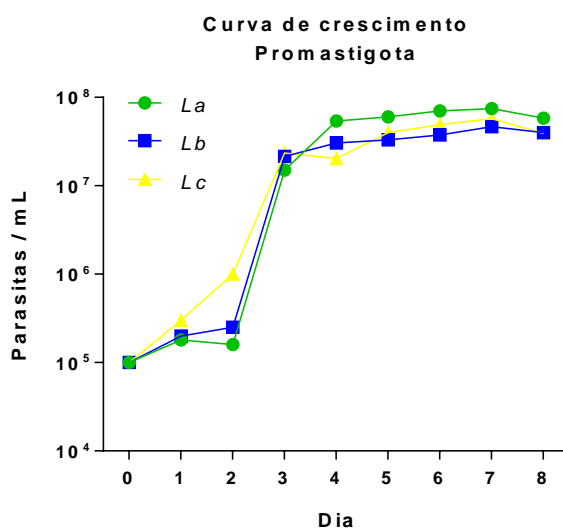


Figura 1: Curva de crescimento da forma promastigota das três espécies ao longo de oito dias. Observa-se fase estacionária do parasito no 7º dia. A curva é um resultado representativo de dois ensaios independentes. La = *L. (L.) amazonensis*, Lb = *L. (V.) braziliensis* e Lc = *L. (L.) chagasi*.

Para os ensaios, três diferentes condições foram preparadas: (A) fase exponencial, em que os parasitos foram coletados ao 3º dia, (B) fase estacionária 1, em que os parasitos foram coletados no 7º dia e (C) fase estacionária 2, em que no 6º dia os parasitos foram submetidos a temperatura de 34 °C por 24 horas e coletados no 7º dia (**Figura 2**). Os parasitos foram centrifugados e lavados duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS) a 3000 rpm por 10 min. Após as lavagens, o *pellet* foi utilizado para realização de *western blotting* e para análise proteômica.

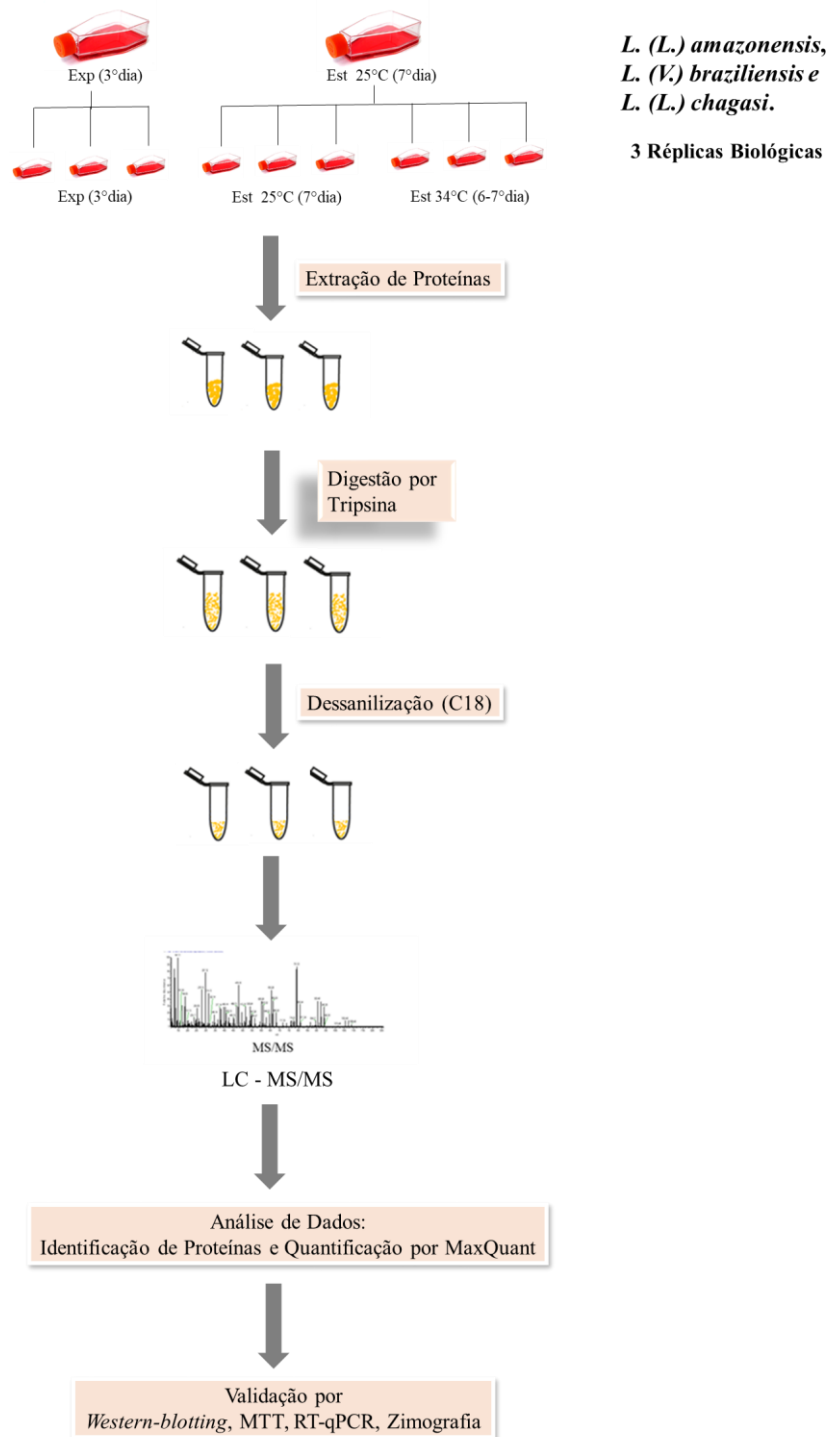


Figura 2: Fluxo de trabalho experimental para estudar a modulação do proteoma de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* em três condições diferentes. As células parasitárias de *Leishmania* foram coletadas em diferentes fases de crescimento e mudança de temperatura: exponencial, estacionária 1 e estacionária 2. As proteínas foram extraídas, digeridas com tripsina e analisadas com nanoLC-MS/MS para identificação e quantificação de proteínas. As proteínas selecionadas foram validadas por meio de técnicas ortogonais como *western-blotting*, MTT, RT-qPCR e Zimografia.

3.2 Ensaio de viabilidade e morte celular

Para analisar a viabilidade dos parasitos utilizados nos experimentos, as espécies de *Leishmania* foram lavadas duas vezes com PBS, contadas e plaqueadas (1×10^6 parasitos por poço) em placa contendo meio M-199 na presença de 0,4% de PFA para impedir a motilidade dos promastigotas e incubadas por 5 min com $10 \mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich) para marcar os parasitos inviáveis. A marcação foi analisada por microscopia de fluorescência. As imagens foram adquiridas em um microscópio DMI6000B/AF6000 (Leica) acoplado a um sistema de câmera digital (DFC 365 FX) e analisadas com o programa Image J.

Continuando a análise para verificar a viabilidade dos parasitos utilizados nos experimentos, as promastigotas das três espécies de *Leishmania* foram mantidas em cultura até o 6º dia. Em seguida os parasitos foram lavados duas vezes com PBS, contados e plaqueados (2×10^6 por poço) em 2 placa contendo meio M-199 suplementado com 20% de SFB e 2% de urina humana. As placas foram mantidas a 25 e 34 °C por 24 h. No 7º dia a densidade óptica foi determinada em um leitor de microplacas (BioTek) em comprimento de onda referência de 690 nm e comprimento de onda teste de 595 nm. Uma curva padrão contendo diferentes quantidades de promastigotas (10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 por poço) foi utilizada para a quantificação.

Uma terceira análise foi realizada, agora para analisar a multiplicação dos parasitos em cultura após exposição a diferentes temperaturas. As formas promastigotas das três espécies de *Leishmania* foram lavadas duas vezes com PBS, contadas e plaqueadas (5×10^5 por mL) em garrafas de 25 cm² contendo meio M-199 suplementado com 20% de SFB e 2% de urina humana. Após 6 dias (25° C), 9 garrafas (3 para cada espécie) foram mantidas a 25 °C, enquanto a outras 9 foram passadas para 34 °C por 24h.

Para avaliar se os parasitos trocados de temperatura (25 para 34 °C) voltavam a se multiplicar após o choque térmico, 1×10^5 parasitos foram transferidos para uma nova garrafa contendo meio fresco suplementado com 20% de SFB e 2% de urina. A análise da multiplicação dos parasitos foi realizada por meio da contagem do número de promastigotas em câmara de Neubauer 3 e 6 dias após. Os resultados foram expressos como parasitos por mL.

3.3 Extração e digestão de proteínas

As proteínas de *Leishmania* foram extraídas em $100 \mu\text{L}$ de Uréia 8M contendo cocktail de inibidores de protease (1x) e DNase, seguido de 5 ciclos congelamento e descongelamento para total lise das células. Uma alíquota de $1 \mu\text{L}$ de cada amostra foi retirada para quantificação

pelo método Qubit. Em seguida foi adicionado Ambic para concentração final de 50mM, reduzidas com DTT 10 mM (DL-Dithiothreitol – SIGMA), alquiladas com iodo-acetamida 40 mM (GE-Healthcare) e digeridas com tripsina na proporção 1:50 (μg tripsina/ μg proteínas) em 50 mM de solução bicarbonato de amônio por 16h a 37°C. A reação foi interrompida com ácido trifluoroacético 1% (pH menor que 2) e dessalinizadas com colunas C18 (StageTips).

3.4 Análise por espectrometria de massas (MS/MS)

Os peptídeos foram analisados por nano-LC-MS/MS em coluna Reprosil-Pur C18- AQ (3 μ ; Dr. Maisch GmbH, Alemanha) utilizando Easy-LC nano-HPLC (Proxeon, Odense, Dinamarca) conectados através de uma fonte de íons nanospray (Thermo Scientific) ao espectrômetro de massa Q Exactive™ HF hybrid quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific). O gradiente de HPLC foi de 0-34% em solvente B (A = 0.1% de ácido fórmico; B = 90% acetonitrila, 0.1% de ácido fórmico), por 70 min em um fluxo de 250 nL/min. A aquisição dependente de dados foi feita em modo positivo. O escaneamento de 400-1600 m/z foi registrado no Orbitrap numa resolução de 120.000, AGC alvo de 3×10^6 e tempo máximo de injeção de 100 ms. Os espectros MS/MS dos 15 peptídeos mais abundantes foram obtidos através de dissociação HCD (*high energy C-trap dissociation*) com aquisição no orbitrap a uma resolução de 30.000. Os parâmetros para a aquisição de HCD foram: janela de isolamento: 1.2 Da; energia de normalização: 28; Alvo AGC: 3×10^6 ; exclusão dinâmica: 30 s; limiar de intensidade: 3.3×10^6 e tempo máximo de injeção de 150 ms.

3.5 Busca em banco de dados e análise bioinformática.

Os arquivos obtidos foram analisados usando o software MaxQuant (<http://www.biochem.mpg.de/5111795/maxquant>) e pesquisados no banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) utilizando diferentes espécies de *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*). Carbamidometilação foi considerada uma modificação fixa enquanto a oxidação de metionina, deamidação de asparagina e acetilação no N-terminal foram consideradas modificações dinâmicas. Os seguintes parâmetros foram utilizados: Clivagem com tripsina e peptídeos com até duas falhas de clivagem; massa do íon precursor: tolerância de 10 ppm; e taxa de detecção falsa (FDR) menor que 0,01 no nível de proteína e peptídeos. A análise quantitativa livre de marcadores foi realizada. A quantificação relativa das proteínas foi calculada utilizando a intensidade XIC (extracted ion chromatogram) dos peptídeos de cada proteína de acordo com o algoritmo *label free quantification* (MaxLFQ) (Cox *et al.*, 2014). O

conjunto de dados foi então analisado com o software Perseus 1.5.3.2. Utilizando essa plataforma, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) como método de redução de dimensões, permitindo o estudo do comportamento das amostras de acordo com as proteínas quantificadas, o diagrama de Venn e t-test (FDR<0,05) apresentado na forma de Volcano plot. As proteínas reguladas foram selecionadas de acordo com Teste ANOVA seguido de correção por Benjamin-Hochberg para determinação das proteínas reguladas ($q < 0,05$). As amostras foram avaliadas de acordo com o agrupamento hierárquico não supervisionado das proteínas reguladas após normalização através de Z-score.

3.6 Ensaio de Termotolerância

Para determinar a resistência dos parasitos à diferentes temperaturas, 200 μ L da suspensão celular contendo 2×10^6 /mL foram plaqueados em placas de 96 poços e incubadas nas diferentes temperaturas: 8, 25, 34, 37 e 42 °C. Após 24 h de incubação foi realizado o ensaio de viabilidade. Para isto, 30 μ L de MTT [(brometo de 3-[4,5-dimetil-2-thiazolil]-2,5-difenil-2H-tetrazólio; 5 mg/mL; (Sigma-Aldrich)] foram adicionados em cada poço e a placa incubada por 3 horas a 25 °C. Para solubilizar os cristais de formazan produzidos pela reação, 50 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% foram adicionados em cada poço. Em seguida a densidade óptica foi determinada em um leitor de microplacas (BioTek) em comprimento de onda referência de 690 nm e comprimento de onda teste de 595 nm.

3.7 PCR quantitativo em tempo Real

Para quantificar a expressão gênica de HSPs, as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* foram mantidas a 25 e 33° C por 24 horas. Em seguida, os parasitos foram lavados duas vezes com PBS e a extração e purificação de RNA foram realizadas utilizando o kit Quick-RNATM MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, Estados Unidos) de acordo com as especificações do fabricante. A quantificação foi realizada em um instrumento NanoDrop (Thermo Scientific) e a síntese complementar de ácido desoxirribonucleico (cDNA) foi realizada utilizando o kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). A reação de PCR quantitativa foi realizada no equipamento StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Iniciadores de oligonucleotídicos, *forward*: 5'- GAT GAC GAC ACT GAA GGA CTA C – 3' e *reverse*: 5'- ACG ACT CCA GCT TCT TCT TG – foram utilizados para amplificar uma porção de cDNA

de HSP 83-1; *forward*: 5'- ATC ACG ATC CAG AAC GAC AC – 3' e *reverse*: 5' - TGT CCT CCT CAG CAA ACT TC – 3' 'foram utilizados para amplificar uma porção de cDNA de HSP70 e *forward*: 5'- GTG TCA TAC GAC GTG GAC ACG – 3' e *reverse*: 5'- CGA CAA GAC GAC CGC ACT CGG C – 3' 'para amplificar o cDNA da Arginase de controle. A reação foi incubada durante 10 min a 95 °C e depois durante 40 ciclos de 15s a 95 °C, seguindo-se 30s a 55 °C e 30s a 72 °C. A fluorescência foi detectada em cada ciclo. As réplicas técnicas foram realizadas para cada reação e controles negativos foram incluídos. Os dados foram apresentados como quantificação relativa normalizada pelo nível de expressão da arginase, sendo calculada usando $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

3.8 SDS-Page e Western-blotting

Os parasitos foram ressuspensos em SDS a 1% com DNase e Halit Protease Inhibitor Coquetel (Fermentas) e lisados por sete ciclos de congelamento e descongelamento.

Para análise SDS-PAGE, os géis foram corados com azul de Coomassie durante uma hora à temperatura ambiente e lavados com solução de descoloração. As intensidades das bandas foram analisadas usando o software ImageJ. Para *Western blotting*, as proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose (GE healthcare) usando o sistema semidry TE 77 (GE healthcare). As membranas foram bloqueadas em PBS com 5% de leite e 0,1% de Tween 20 por uma hora à temperatura ambiente, seguido de incubação durante a noite a 4°C com anti-HSP70 (1:10000; contra *L. (L.) major*), anti-GP63 (1: 5000; mAb CP3.235 contra *L. (L.) major*) e anticorpos primários anti- α -tubulina (1: 5000; contra várias espécies Sigma /T5168) diluídos em PBS com 2,5% de leite e 0,1% de Tween 20. Depois, as membranas foram lavadas três vezes com PBS 0,1% Tween 20 antes da incubação com anti-mouse (1: 10000 KPL) ou anticorpos secundários conjugados com HRP anti-chicken (1: 160000) diluídos em PBS com leite a 2,5% e Tween a 0,1% durante 1 hora à temperatura ambiente. Após cinco etapas de lavagem, três com PBS 0,1% de Tween 20 e duas com PBS, as membranas foram incubadas com Reagente de Detecção de *Western Blotting* da ECL (GE healthcare). A quimioluminescência foi detectada pelo sistema de imagens ChemiDoc XRS + (BioRad). As intensidades das bandas foram analisadas usando o software ImageJ e os resultados foram normalizados para intensidades das bandas de Coomassie.

4. RESULTADOS

4.1 Análise proteômica comparativa das espécies de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*.

O proteoma das espécies de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* foi analisado por meio da abordagem proteômica “bottom-up” quantitativa, baseada em espectrometria de massas, seguida de análise estatística e validação funcional utilizando técnicas ortogonais (Figura 2). As células de *Leishmania* foram coletadas em três condições diferentes: fase exponencial/logarítmica, fase estacionária 1 (25°C) e fase estacionária 2 (34°C) (Figura 1). O parasito na fase exponencial foi coletado no 3º dia de cultura enquanto o parasito na fase estacionária 1 foi coletado no 6º dia. Em ambas as condições os parasitos foram mantidos a 25°C. Para simular o efeito da mudança de temperatura do contato do parasito com a pele do hospedeiro vertebrado, coletamos os parasitos na condição de fase estacionária 2, os quais foram obtidos de parasitos no 6º dia e incubados a 34°C por 24 h. A viabilidade das células parasitas foi avaliada por coloração com iodeto de propídio e microscopia de fluorescência (Figura 3). Uma viabilidade acima de 99% foi detectada, representando um ponto importante no estudo do proteoma.

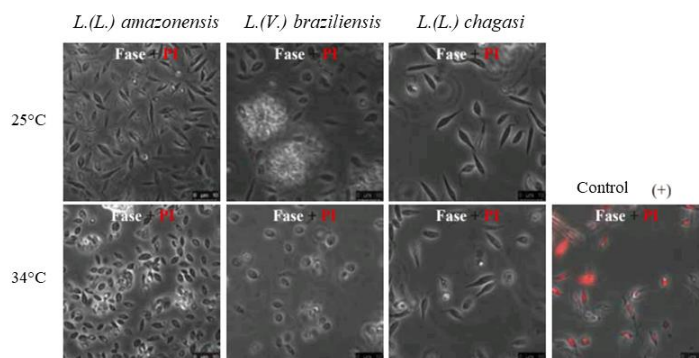


Figura 3: Ensaio de viabilidade com iodeto de propídio. Os parasitos foram tratados com PFA a 0,4% e 10 µ/mL de iodeto de propídio por 5 min. O controle (+) foi feito pelo tratamento dos parasitos com DMSO.

Proteínas extraídas das três espécies de *Leishmania* e nas três condições foram inicialmente separadas em SDS-PAGE para a visualização do perfil proteico (Figura 4). O padrão eletroforético entre as espécies e condições apresentou semelhanças e diferenças. Estas características nos levaram a estudar a modulação do proteoma nas espécies de *Leishmania* em três condições diferentes.

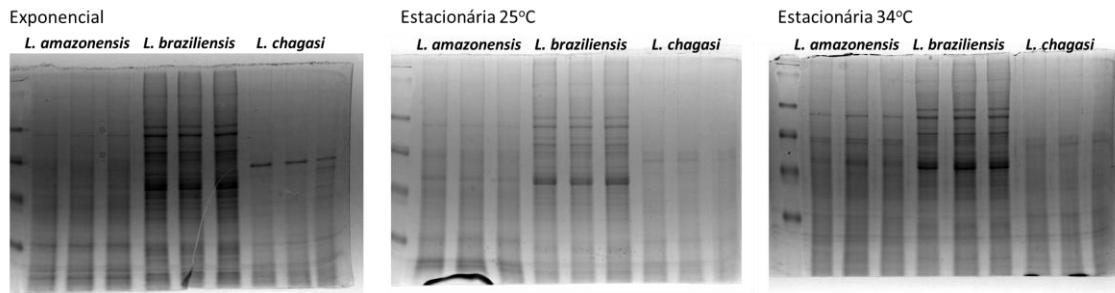


Figura 2: Perfil proteômico através de SDS-PAGE 12% das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*. Os parasitos foram coletados ao 3º dia (fase exponencial) e ao 7º dia (fases estacionárias). Coloração Coomassie Blue.

Uma abordagem "shotgun proteomics" baseada em espectrometria de massa em larga escala foi aplicada para estudar o proteoma diferencial da *L. (L.) amazonensis* (La), (*V. braziliensis* (Lb) e *L. (L.) chagasi* (Lc). As três espécies foram analisadas em 3 condições exponencial/logarítmica (Exp), estacionária 25°C (1) e estacionária 34°C (2). A primeira análise foi focada na comparação entre as espécies nas 3 condições. Para a fase exponencial foram identificadas um total de 2119, 3135 e 3089 proteínas para as espécies La, Lb e Lc, respectivamente (**Figura 5A**). Tais proteínas foram mapeadas com uma média de 4,1, 4,9 e 5,3 peptídeos por proteína em La, Lb e Lc, respectivamente. Para a fase estacionária a 25°C, um total de 878, 2208 e 2030 proteínas foram identificadas para La, Lb e Lc, respectivamente. Estas proteínas foram mapeadas com uma média de 5,6, 6,1 e 6,5 peptídeos por proteína em La, Lb e Lc, respectivamente. Para a fase estacionária a 34°C, um total de 3168, 4414 e 3830 proteínas foram identificadas para La, Lb e Lc, respectivamente. Estas proteínas foram mapeadas com uma média de 2,1, 3,4 e 3,1 peptídeos por proteína em La, Lb e Lc, respectivamente. Comparando as três condições, independentemente da espécie, um total de 6494, 3800 e 4155 proteínas foram identificadas nas condições exponencial, estacionária a 25°C e estacionária a 34°C (**Figura 5A**). Um grande número de proteínas únicas (21%) foi identificado para a fase exponencial (**Figura 5B**). Ao compararmos as três condições em cada espécie, detectou-se um maior número de proteínas na fase estacionária a 34°C em relação a exponencial e estacionária a 25°C (**Figura 5A**). O algoritmo *label free quantification* (LFQ) foi utilizado para extrair a intensidade de cada peptídeo identificado e para inferir a abundância relativa das proteínas nas três espécies. Estes valores de intensidade foram utilizados para comparar a abundância das proteínas entre as espécies e entre as três condições.

A

Fases	Espécies	Peptídeos Únicos	Proteínas
Exponencial/Log	<i>Leishmania amazonensis</i>	8703	2119 (1526 ± 190)
	<i>Leishmania braziliensis</i>	15665	3135 (2143 ± 610)
	<i>Leishmania chagasi</i>	16641	3089 (2394 ± 349)
	Total	29421	6494
Estacionária 1 (25°C)	<i>Leishmania amazonensis</i>	4946	878 (615 ± 63)
	<i>Leishmania braziliensis</i>	13529	2208 (1719 ± 140)
	<i>Leishmania chagasi</i>	13363	2030 (1696 ± 68)
	Total	24690	3800
Estacionária 2 (34°C, 24h)	<i>Leishmania amazonensis</i>	6742	3168 (2481 ± 119)
	<i>Leishmania braziliensis</i>	15367	4414 (3589 ± 161)
	<i>Leishmania chagasi</i>	11905	3830 (3215 ± 95)
	Total	25833	4155

B

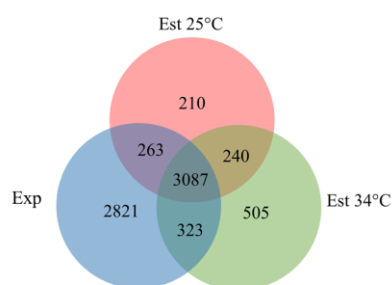


Figura 5: Quantidade de Proteínas identificadas em *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* nas condições exponencial e estacionária a 25°C e 34°C. A) Número de peptídeos e proteínas identificados nas três espécies e nas três condições, seguido pela média e desvio padrão das três repetições biológicas. B) Diagrama de Venn mostrando a relação entre as 3 condições: exponencial, estacionária 25°C e estacionária 34°C sem distinção entre as espécies.

Uma análise multivariada do perfil de proteínas totais entre as três espécies na fase exponencial revelou que *L. (L.) amazonensis* apresenta um perfil intermediário entre as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* (**Figura 6A**). De um total de 3733 proteínas identificadas, após a seleção de proteínas quantificadas em no mínimo duas réplicas biológicas em pelo menos uma espécie, 148 proteínas (3,9%) foram identificadas reguladas, após correção de Benjamin-Hochberg ($p < 0,05$), entre as três espécies nessa condição, como mostrado no “*heat map*” (**Figura 6D**). *L. (L.) chagasi* apresenta dois “clusters” (a e b) com 95 proteínas que estão mais expressas em relação a *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. A maioria dessas proteínas estão envolvidas em vias metabólicas, enquanto 15% são quinases, proteínas ribossômicas e proteínas de choque térmico.

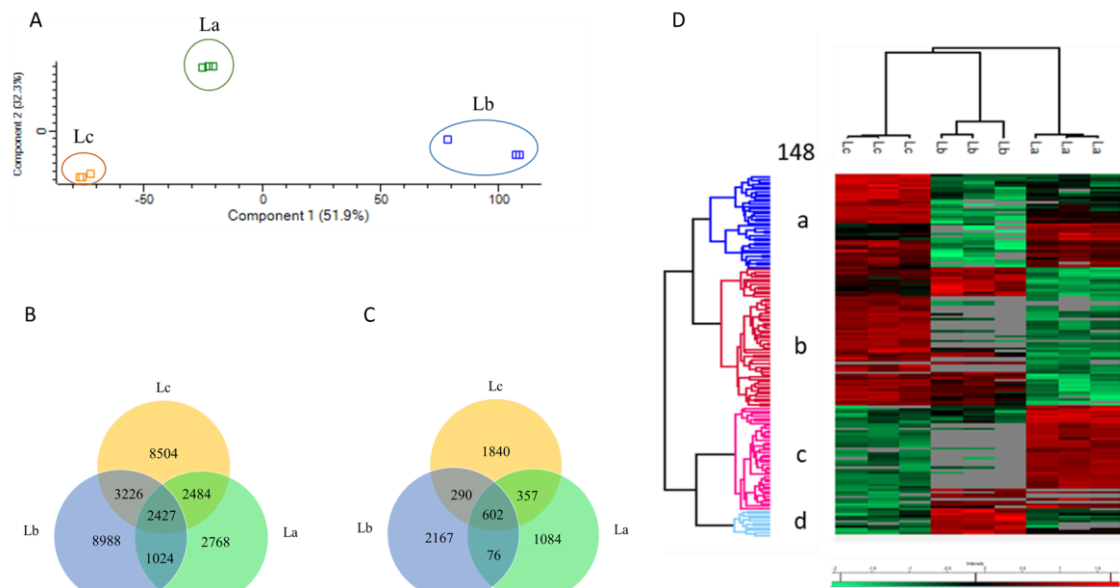


Figura 6: Comparação do perfil proteômico da fase exponencial entre as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*. A) PCA realizado com proteínas totais, antes da aplicação de teste ANOVA. B) Diagrama de Venn de peptídeos entre as espécies. C) Diagrama de Venn de proteínas entre as espécies. D) “Heat Map” das proteínas reguladas (ANOVA, $p < 0.05$, com correção de Benjamin-Hochberg) e aplicação de distância euclidiana, tendo pelo menos 2 valores válidos por grupo/espécie. As proteínas de maior expressão em uma espécie particular estão representadas pela cor vermelha, as menos expressas pela cor verde, ausente em cinza, e em preto aquelas que não têm diferença na expressão.

A análise multivariada do perfil proteico total entre as três espécies de *Leishmania* na fase estacionária a 25 °C confirmou o perfil intermediário de *L. (L.) amazonensis* entre as outras duas espécies. (**Figura 7A**). De um total de 3045 proteínas identificadas, após a seleção de proteínas quantificadas em no mínimo duas réplicas biológicas em pelo menos uma espécie, 124 proteínas (4,0%) foram identificadas reguladas, após correção de Benjamin-Hochberg ($p < 0,05$) (**Figura 7D**). *L. (V.) braziliensis* apresenta 48 proteínas mais expressa em comparação às outras duas espécies (clusters a e b), sendo 26% dessas proteínas representadas por quinases, proteínas ribossômicas e proteínas de choque térmico. *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* mostram 59 proteínas mais expressas (cluster b) em comparação a *L. (V.) braziliensis*, 13% das quais são representadas por proteínas de choque térmico.

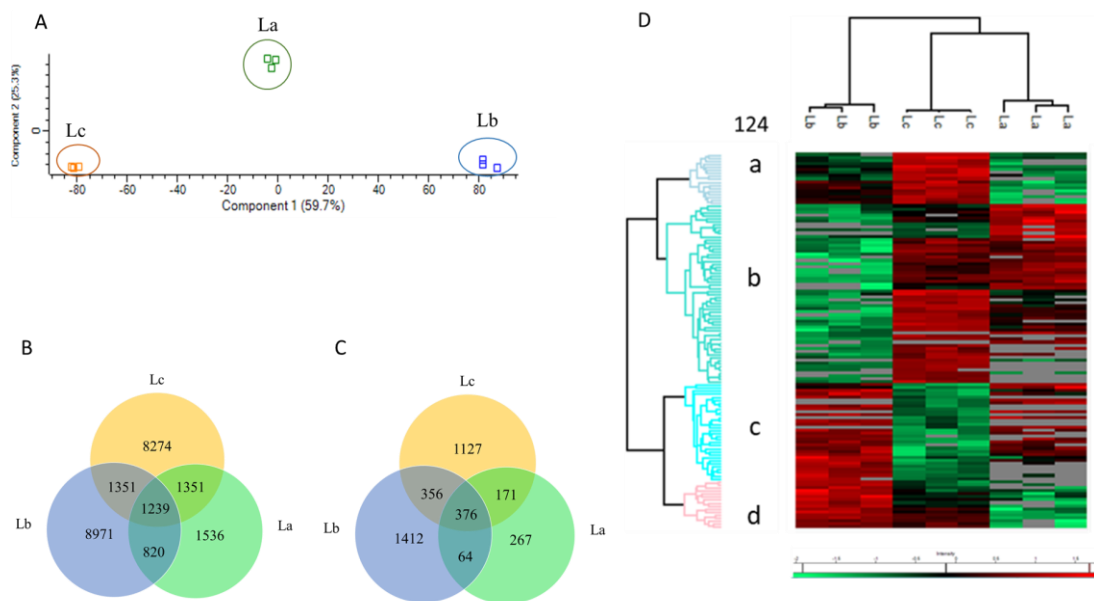


Figura 7: Comparação do perfil proteômico da fase estacionária a 25 °C entre as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*. A) PCA realizado com proteínas totais, antes da aplicação de teste ANOVA. B) Diagrama de Venn de peptídeos entre as espécies. C) Diagrama de Venn de proteínas entre as espécies. D) “Heat Map” das proteínas reguladas (ANOVA, $p < 0.05$, com correção de Benjamin-Hochberg) e aplicação de distância euclidiana, tendo pelo menos 2 valores válidos por grupo/espécie. As proteínas de maior expressão em uma espécie particular estão representadas pela cor vermelha, as menos expressas pela cor verde, ausente em cinza, e em preto aquelas que não têm diferença na expressão.

A análise multivariada do perfil proteico total entre as três espécies de *Leishmania* na fase estacionária a 34 °C mostrou uma similaridade entre *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* em relação a *L. (V.) braziliensis* (**Figura 8A**). Este perfil foi diferente da estacionária a 25 °C e a fase exponencial indica uma modulação diferencial do proteoma das três espécies de *Leishmania* quando da alteração térmica. De um total de 3148 proteínas identificadas, após a seleção de proteínas quantificadas em no mínimo duas réplicas biológicas em pelo menos uma espécie, 116 proteínas (3,6%) foram identificadas reguladas, após correção de Benjamin-Hochberg ($p < 0,05$) (**Figura 8D**). As proteínas mais reguladas estão envolvidas em vias metabólicas. *L. (L.) amazonensis* apresenta 28 proteínas mais expressas (cluster a). *L. (V.) braziliensis* apresenta 58 proteínas mais expressas (clusters c e d) sendo 18 nesta espécie em relação a *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* das quais 33% são proteínas não caracterizadas, 11% proteínas de choque térmico e 56% proteínas de vias metabólicas. 22 são mais expressas em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* em relação a *L. (L.) amazonensis* (cluster c). *L. (L.) chagasi* apresenta aproximadamente 30 proteínas mais expressas (cluster b) quando comparado com as outras duas espécies e 26,7% destas proteínas não são caracterizadas. Estes dados demonstram a regulação do proteoma dependente da espécie de *Leishmania* com vias reguladas específicas.

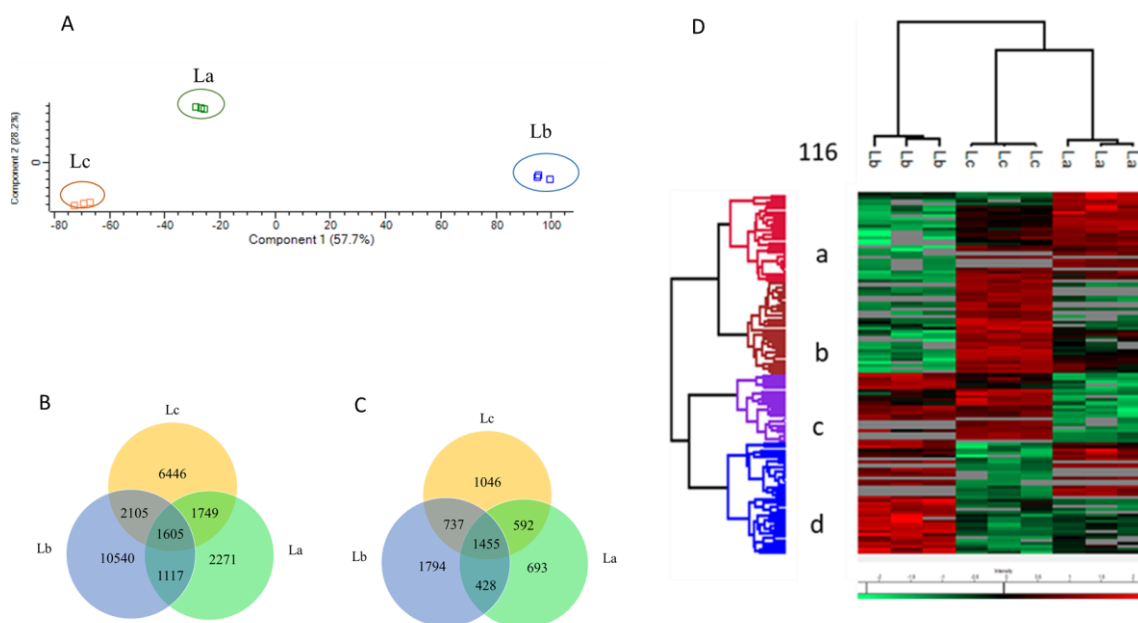


Figura 8: Comparação do perfil proteômico da fase estacionária a 34°C entre as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi*. A) PCA realizado com proteínas totais, antes da aplicação de teste ANOVA. B) Diagrama de Venn de peptídeos entre as espécies. C) Diagrama de Venn de proteínas entre as espécies. D) “Heat Map” das proteínas reguladas (ANOVA, $p < 0.05$, com correção de Benjamin-Hochberg) e aplicação de distância euclidiana, tendo pelo menos 2 valores válidos por grupo/espécie. As proteínas de maior expressão em uma espécie particular estão representadas pela cor vermelha, as menos expressas pela cor verde, ausente em cinza, e em preto aquelas que não têm diferença na expressão.

Uma outra análise, agora comparando somente duas espécies também foi realizada nas 3 condições (**Figura 9**). Podemos visualizar um perfil de proteínas reguladas através do “volcano-test”. A análise realizada para a fase exponencial mostra um destaque para a diferença na regulação de proteínas entre as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* com um total de 317 proteínas (**Figura 9A**). Para as espécies *L. (L.) amazonensis* contra *L. (V.) braziliensis* foram identificadas 131 proteínas reguladas e para as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* 152. Em geral as proteínas encontradas reguladas são em sua maioria proteínas não caracterizadas, seguidas por proteínas de vias metabólicas. A análise realizada para a fase estacionária a 25 °C já vemos um perfil diferente. A diferença entre as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* aumenta apresentando 218 proteínas reguladas (**Figura 9B**), enquanto *L. (L.) amazonensis* contra *L. (V.) braziliensis* se mantém constante e *L. (L.) amazonensis* contra *L. (L.) chagasi* diminui. Esse resultado sugere que na condição estacionária a 25 °C *L. (L.) amazonensis* apresenta um perfil semelhante com as outras duas espécies. A análise realizada para a fase estacionária a 34 °C mostra um aumento no número de proteínas reguladas entre as espécies, mostrando que nessa temperatura há uma maior modulação

proteica, diferenciando as espécies entre si (**Figura 9B**). Para as espécies *L. (L.) amazonensis* contra *L. (V.) braziliensis* foram identificadas 153 proteínas reguladas, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* 190 e para as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* 186.

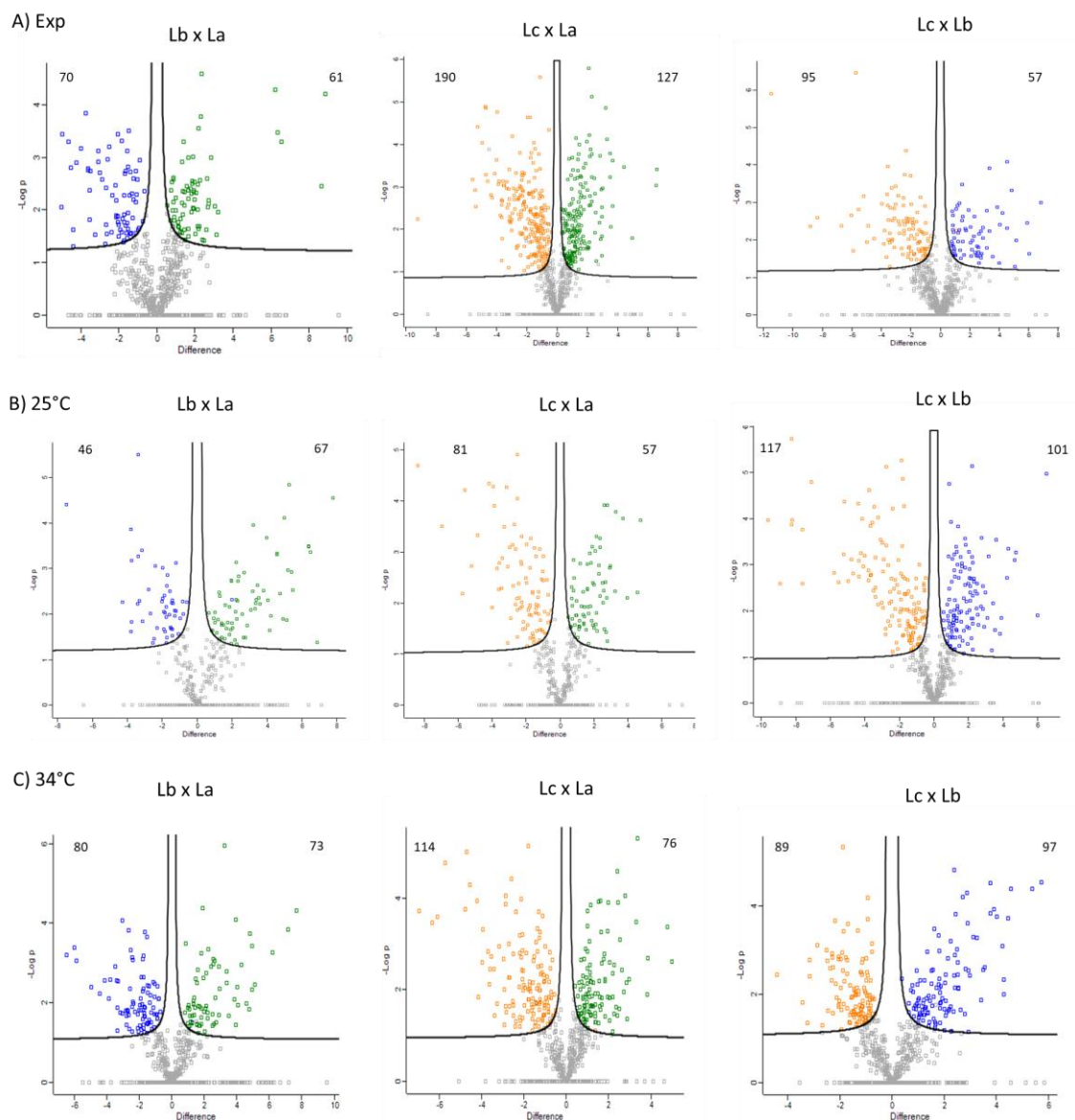


Figura 9: Comparação dois a dois de proteínas reguladas entre *L. (L.) amazonensis* (*La*), *L. (V.) braziliensis* (*Lb*) e *L. (L.) chagasi* (*Lc*) utilizando *Volcano-test*. A) exponencial (Exp), estacionária 25°C (25°) e estacionária 34°C (34°). *Volcano-test* (FDR<0,05).

A análise da ontologia genética das famílias de proteínas relacionadas com proteínas reguladas em cada condição, foi realizada a partir de oito famílias de proteínas: ribossômicas, quinases, proteínas de choque térmico (HSPs), fosfatases, transportadoras, gp63, histonas e proteínas envolvidas em estresse oxidativo. Para a fase exponencial (**Figura 10A**) o destaque é para a *L. (L.) chagasi* que possui proteínas reguladas em quase todos os grupos, com exceção

para histonas. *L. (V.) braziliensis* apresenta somente proteínas reguladas do tipo ribossomais, HSP e quinases, enquanto *L. (L.) amazonensis* apresenta somente quinases e fosfatases. Na fase estacionária a 25 °C (**Figura 10B**) vemos um aumento na porcentagem de proteínas ribossomais para *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* e diminuição para *L. (V.) braziliensis*. Para HSP vemos um aumento significativo para *L. (L.) amazonensis* e diminuição para *L. (L.) chagasi*, enquanto para quinases um aumento para *L. (V.) braziliensis* e diminuição para *L. (L.) chagasi* em relação a fase exponencial. A fase estacionária a 34 °C (**Figura 10C**) vemos uma diminuição na porcentagem de proteínas ribossomais e um aumento de HSP e quinase para *L. (L.) chagasi*. Para as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* houve diminuição de HSP. A porcentagem de fosfatase se manteve estável nas 3 condições para *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* não sendo encontrada regulada para *L. (V.) braziliensis*, assim como gp63 para *L. (L.) chagasi*. Também vemos um aumento de proteínas envolvidas em estresse oxidativo para as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, quanto que para *L. (L.) chagasi*, a porcentagem se manteve estável. Em resumo, os grupos de proteínas ribossomais, HSP e quinases são os que apresentam regulação considerando as 3 espécies de *Leishmania*, sendo a *L. (L.) chagasi* a que possui a maior regulação de proteínas entre as 3 espécies.

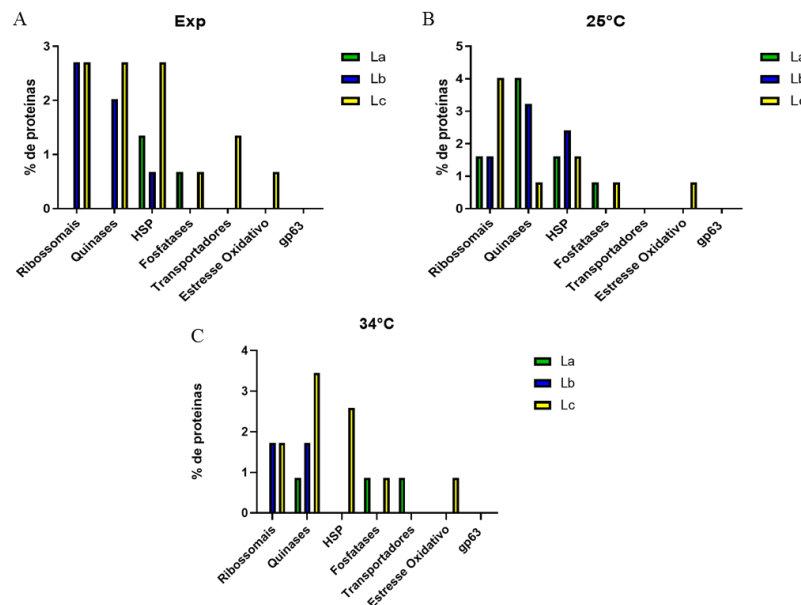
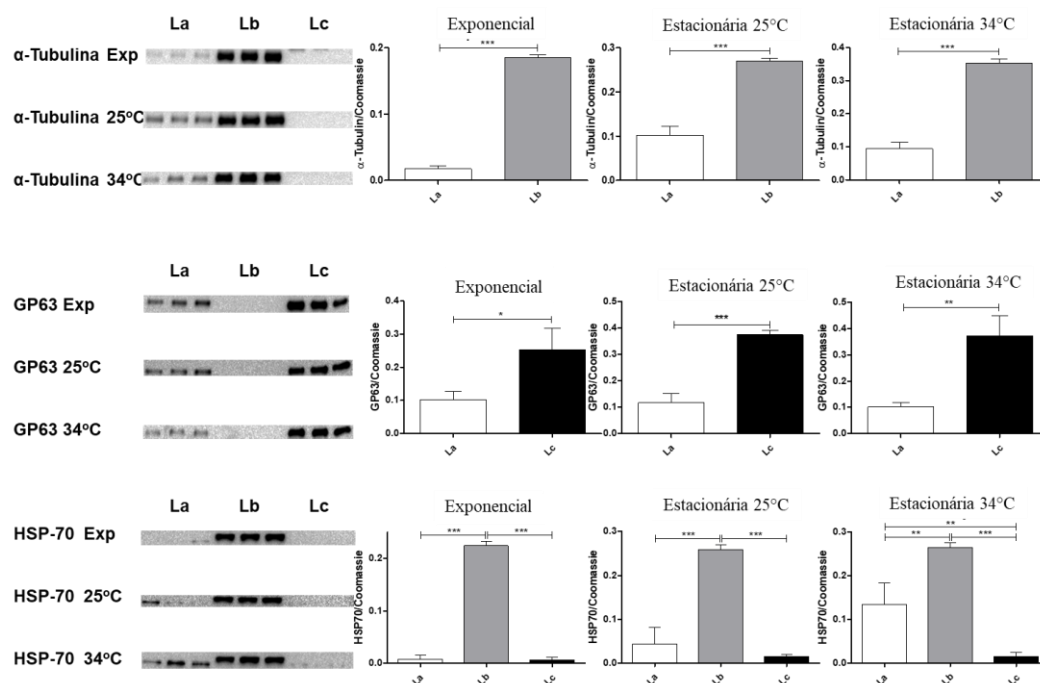


Figura 3: Ontologia genética e expressão quantitativa por espécie nas 3 condições. A) Exponencial, B) Estacionária a 25°C e C) Estacionária a 34°C. A quantidade de proteínas reguladas está em porcentagem em relação ao valor total em cada condição e foram obtidas através da análise ANOVA, $p < 0,05$, com correção Benjamin-Hochberg e separadas por grupos. O filtro aplicado foi o nome das proteínas. Consideramos nesse gráfico a espécie com maior expressão entre as 3 espécies e valores de expressão a partir de 2 vezes em relação a 1 ou 2 espécies.

Para validar a expressão de proteínas específicas identificadas diferencialmente entre as

três espécies em cada uma das condições experimentais, realizou-se um ensaio de *western blot* para α -tubulina, gp63 e HSP-70. Cada banda foi quantificada e normalizada para a carga total de proteína medida por coloração com Coomassie. A expressão de α -tubulina medida por *western blot* mostrou maior expressão em *L. (V.) braziliensis* em comparação a *L. (L.) amazonensis* (**Figura 11A**). Curiosamente, o uso de um anticorpo pan-reactivo contra tubulina não detectou nenhum sinal para *L. (L.) chagasi* e não foi possível relatar qualquer quantificação (**Figura 11A**). A quantificação da α -tubulina baseada em espectrometria de massas entre as três espécies permitiu a detecção de duas α -tubulinas, E9AGJ8 (LINF_130007800) e A4H727 (LBRM_13_0190). E9AGJ8 foi encontrada regulada na fase exponencial, sendo mais expressa na espécie *L. (L.) chagasi* em relação à *L. (L.) amazonensis*. Esta proteína não foi identificada na espécie *L. (V.) braziliensis* (**Figura 12A**). Para fase estacionária a 25°C, nenhuma α -tubulina foi encontrada regulada, embora β -tubulina A4HLD6 (LBRM_33_1010) tenha sido encontrada mais expressa em *L. (L.) chagasi* em comparação à *L. (V.) braziliensis*. Para fase estacionária a 34°C, E9AGJ8 apresentou comportamento semelhante a fase exponencial, enquanto a α -tubulina A4H727 foi mais expressa em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* em comparação com *L. (L.) amazonensis* (Lb>Lc>La) (**Figura 12A**).



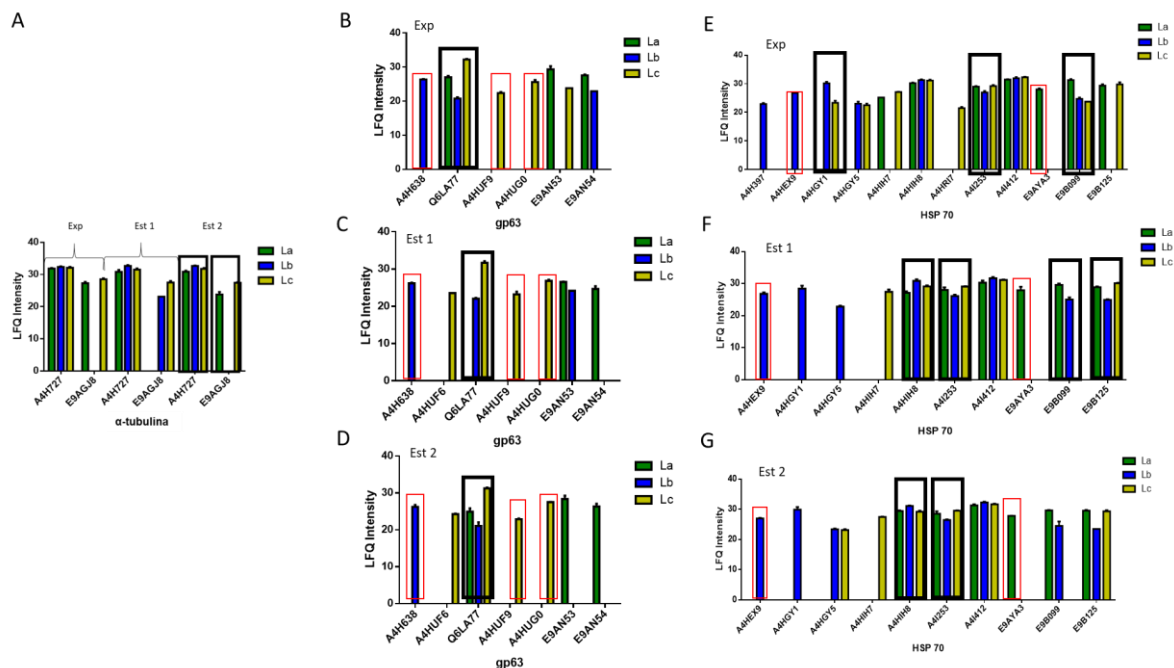


Figura 12: Proteínas α -tubulina (A), gp63: B (exp), C(Est1) e D(Est2) e HSP-70: E (exp), F(Est1) e G(Est2) identificadas e reguladas por condição em proteômica baseada em espectrometria de massa. Exponencial (Exp), estacionária a 25C (Est 1) e estacionária a 34C (Est 2). As proteínas destacadas com caixa preta são as proteínas reguladas e as vermelha so proteínas únicas de cada espécie. Os resultados são expressos em Log₂ (LFQ Intensity).

A expressão de gp63 detectada por *western blotting* utilizando um anticorpo contra gp63 foi maior em *L. (L.) chagasi* comparado a *L. (L.) amazonensis* nas três condições experimentais (**Figura 11B**). O anticorpo utilizado não reconheceu qualquer proteína em *L. (V.) braziliensis*. A análise proteômica baseada em espectrometria de massa permitiu a detecção de seis proteínas GP63 A4H638 (LBRM_10_0590), Q6LA77 (GP63-2), A4HUF9 (GP63-3), A4HUG0 (GP63-3), E9AN53 (LMXM_10_0460) e E9AN54 (LMXM_10_0390). Um grupo de proteínas definido pelo Q6LA77 (gp63) ou A4HUF8 (GP63-1) número de acesso, foi encontrado regulado nas três condições (**Figura 12B**). Na fase exponencial e estacionária a 34C, esta proteína foi identificada nas três espécies, sendo mais expressa em *L. (L.) chagasi* em relação às outras duas espécies. (Lc>La>Lb) (**Figura 12B e 12D**). Na fase estacionária a 25C, o gp63 foi identificado regulado entre as espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis* (Lc>Lb) não sendo identificado em *L. (L.) amazonensis* (**Figura 12C**).  possível notar a presença de gp63 únicas em certas espécies como A4H638 para *L. (V.) braziliensis* e A4HUF9 e A4HUG0 para *L. (L.) chagasi* (**Figura 12B, 12C e 12D em vermelho**). A atividade proteolítica foi avaliada por zimografia utilizando o colágeno como substrato. O colágeno é adequado para a detecção de MMP1, 2, 9 e 13 (Frankowski *et al.*, 2012). O padrão proteolítico entre as três espécies e

condições foi diferente (**Figura 13A**). A quantificação da atividade proteolítica total revelou na fase exponencial uma maior atividade para *L. (L.) amazonensis* seguida por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*. Na fase estacionária a 25°C, uma maior atividade foi detectada em *L. (L.) amazonensis*, seguida por *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) braziliensis*. O mesmo padrão foi observado para a fase estacionária a 34°C (**Figura 13A**).

A expressão de HSP70 detectada por *western blotting* utilizando um anticorpo contra HSP-70 foi maior em *L. (V.) braziliensis* em comparação com *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* nas três condições experimentais (**Figura 11C**). A proteômica quantitativa baseada em espectrometria de massas revelou a regulação de três proteínas de choque térmico na fase exponencial, A4H6Y1 (LBRM_12_0680), A4I253 (HSP70.4) e E9B099 (LMXM_28_2770) (**Figura 12E**). Cada uma delas apresentou regulação diferente entre as espécies, o que sugere uma função específica em cada uma delas. A4H6Y1 foi encontrada mais expressa em *L. (V.) braziliensis* comparado a *L. (L.) chagasi*, não tendo sido identificado em *L. (L.) amazonensis* (Lb>Lc). A4I253 foi encontrada mais expressa em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* em comparação com *L. (V.) braziliensis* (La = Lc> Lb). E9B099 foi encontrada mais expressa em *L. (L.) amazonensis* comparado a *L. (V.) braziliensis* (La>Lb; La=Lc; Lb=Lc). Na fase estacionária a 25°C (**Figura 12F**), quatro HSPs foram encontradas reguladas entre as três espécies. A4HIH8 (LBRM_30_2420), apresentou maior expressão em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* em comparação a *L. (L.) amazonensis* (Lb=Lc>La). A4I253 apresentou o mesmo perfil da fase exponencial com maior expressão nas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* em comparação com *L. (V.) braziliensis* (La=Lc>Lb). E9B099 teve maior expressão para *L. (L.) amazonensis* e menor expressão em *L. (V.) braziliensis*, não tendo sido identificada em *L. (L.) chagasi* nesta condição. E9B125 (LMXM_29_2550) está mais expressa em *L. (L.) chagasi* comparada a *L. (L.) amazonensis* e menos expressa em *L. (V.) braziliensis* (Lc>La>Lb). Na fase estacionária a 34°C (**Figura 12G**), duas HSPs foram encontradas reguladas. A4HIH8, apresentou maior expressão em *L. (V.) braziliensis* em comparação às outras duas espécies (Lb>Lc=La) e E9B125, apresentou maior expressão em *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* em relação a *L. (V.) braziliensis* (Lc=La>Lb). A regulação das proteoformas A4H6Y1 e A4HIH8 HSP-70 confirmam os dados do *western blotting* mostrando também a regulação específica e diferencial das proteoformas de HSP-70.

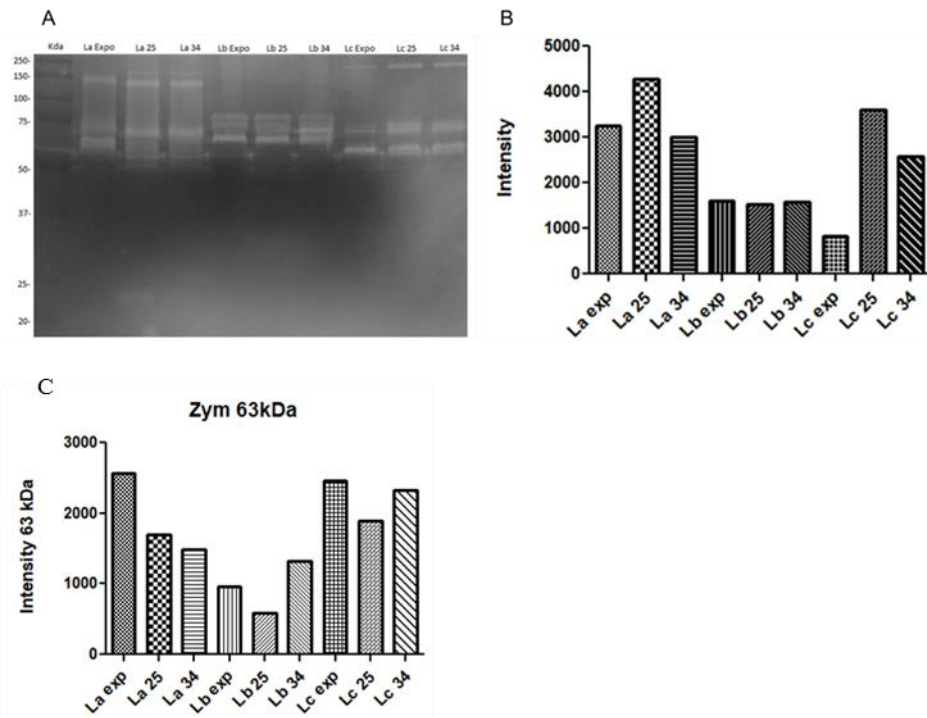


Figura 4: Atividade Proteolítica de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* nas condições exponencial (Expo), estacionária 25°C (25) e estacionária 34°C (34). A) Degradação de colágeno na extração de proteínas corridas em SDS-PAGE. B) Quantificação total da atividade proteolítica expressa como intensidade de degradação das bandas. C) Quantificação total da atividade proteolítica da banca com peso molécula de 63kDa.

4.2 Modulação de proteínas de *Leishmania* durante a transição da fase de crescimento e mudança de temperatura.

A segunda análise proteômica foi focada na comparação das três condições para cada espécie de *Leishmania*.

Leishmania (Leishmania) amazonensis

Um total de 195 proteínas foram reguladas em *L. (L.) amazonensis* comparando as três condições (**Figura 14D**). A análise multivariada utilizando o total de proteínas de *L. (L.) amazonensis* identificadas separou a fase exponencial das demais condições (**Figura 14A**). Comparando as duas fases estacionárias, foram identificadas 118 proteínas reguladas, 83 presentes na fase estacionária a 25°C sendo 10 proteínas de choque térmico (12%), enquanto 35 estão presentes na fase estacionária a 34°C, sendo 4 proteínas *paraflagellar*, representando 11% do total nessa fase (**Figura 14C**).

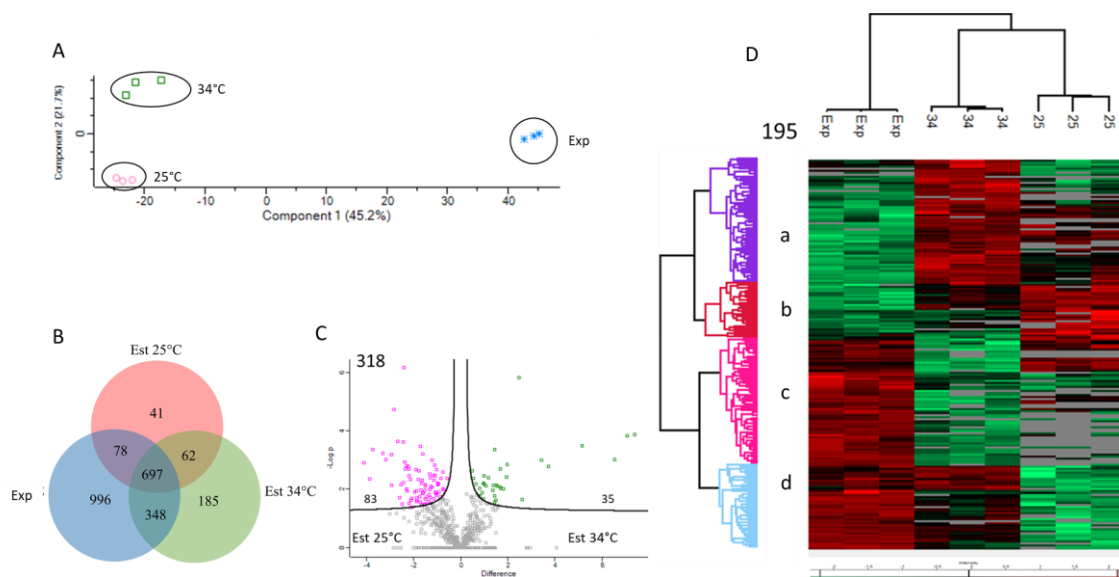


Figura 14: Comparação do perfil proteômico em *L. (L.) amazonensis* nas condições exponencial, estacionária a 25°C e estacionária a 34°C. Em A) PCA realizado com proteínas totais, antes da aplicação de teste ANOVA. B) Diagrama de Venn de proteínas entre as condições. C) *Volcano-test* realizado entre as condições estacionárias (FDR<0.05). Em rosa fase estacionária a 25°C e em verde fase estacionária a 34°C. D) “Heat Map” das proteínas reguladas (ANOVA, $p < 0.05$, com correção Benjamin-Hochberg) e aplicação de distância euclidiana, tendo pelo menos 2 valores válidos por grupo/espécie. As proteínas de maior expressão em uma espécie particular são representadas pela cor vermelha, a menos expressa pela cor verde, ausente em cinza, e em preto aquelas que não têm diferença na expressão.

Leishmania (Viannia) braziliensis

Para *L. (V.) braziliensis*, é possível observar que as fases exponencial e estacionária são muito diferentes (**Figura 15A**), mas embora o número de proteínas para esta espécie seja maior (52%) que para *L. (L.) amazonensis*, esta espécie apresentou proteínas reguladas entre as fases exponencial e estacionária, mas não entre as duas condições estacionárias (**Figura 15**). Uma possível explicação para esse resultado é a grande variedade entre as réplicas biológicas da espécie, que pode ser visualizado já no PCA (**Figura 15A**), de forma que ao aplicar teste ANOVA ou *Volcano-test* os grupos não estão bem definidos.

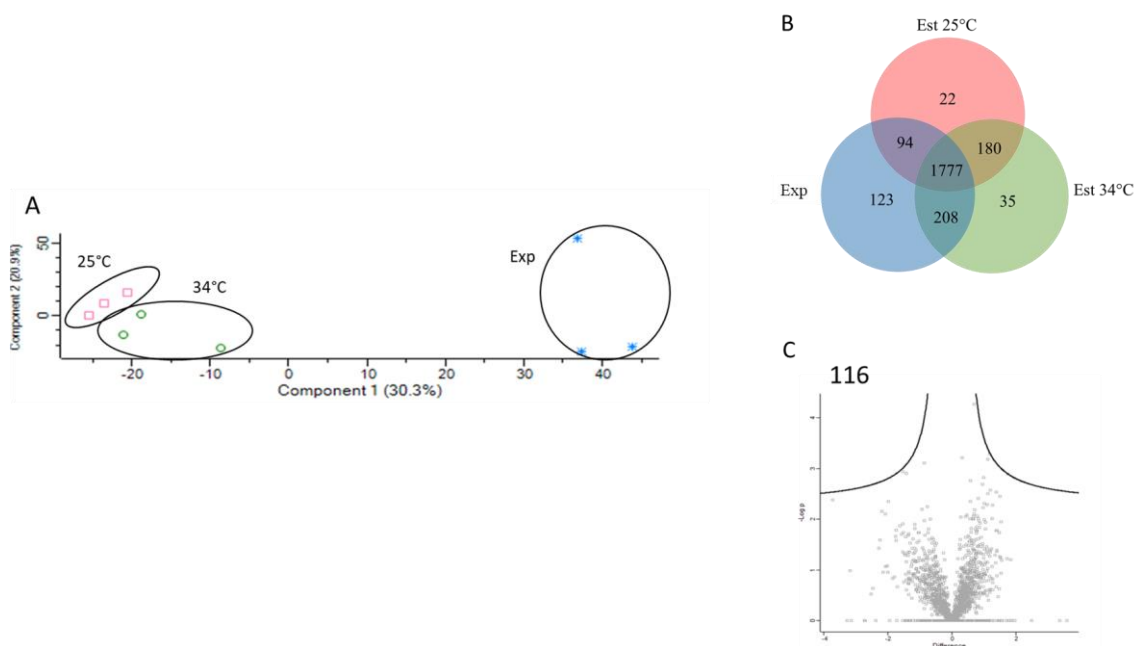


Figura 15: Comparação do perfil proteômico em *Leishmania (V.) braziliensis* nas condições exponencial, estacionária a 25°C e estacionária a 34°C. Em A) PCA realizado com proteínas totais, antes da aplicação de teste ANOVA. B) Diagrama de Venn de proteínas entre as condições. C) *Volcano-test* realizado entre as condições estacionárias (FDR<0.05).

Leishmania (Leishmania) chagasi

L. (L.) chagasi apresenta o mesmo padrão que a espécie *L. (L.) amazonensis*. Uma distinção entre as fases exponencial e estacionária e entre as condições estacionárias podem ser visualizadas (**Figura 16A e 156**). Um total de 420 proteínas reguladas foram identificadas em *L. (L.) chagasi*, sendo um grupo muito bem definido de 214 proteínas mais expressas na fase exponencial (cluster c) (**Figura 16D**). No entanto, 23% são proteínas não caracterizadas e 4% de proteínas de choque térmico. A grande maioria são proteínas envolvidas nas vias metabólicas. Quando as fases estacionárias são comparadas, é possível identificar diferentes proteínas reguladas. Das 108 proteínas reguladas entre as duas fases estacionárias, 46 estão

presentes na fase estacionária a 25°C, sendo 10 proteínas de choque térmico, ou seja, 12% das proteínas reguladas, enquanto 62 estão na fase estacionária a 34°C, sendo 4 proteínas paraflagellar, 11% do número total.

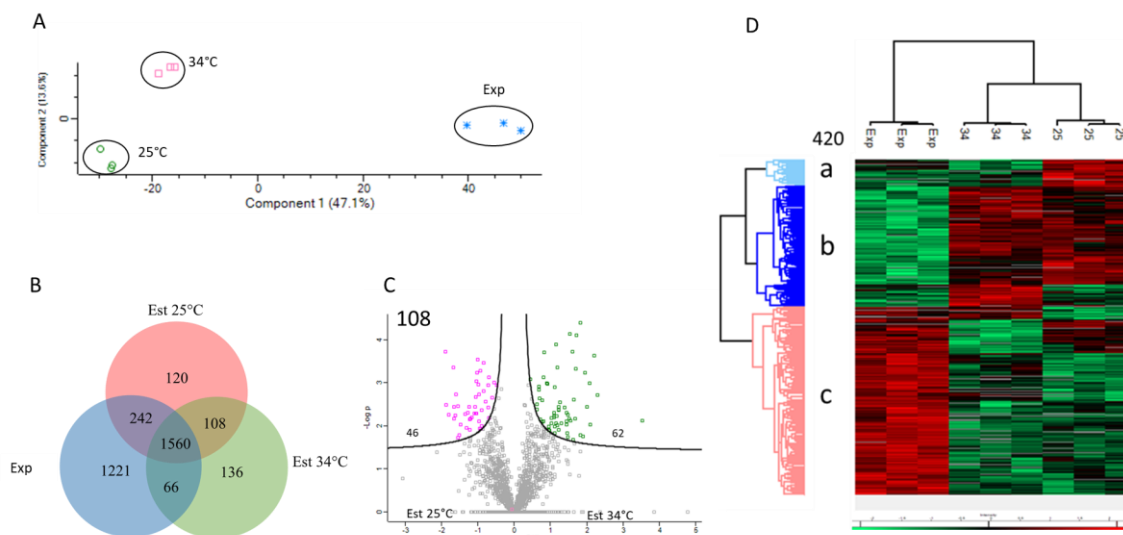


Figura 16: Comparação do perfil proteômico em *L. (L.) chagasi* nas condições exponencial, estacionária a 25 °C e estacionária a 34 °C A) PCA realizado com proteínas totais, antes da aplicação de teste ANOVA. B) Diagrama de Venn de proteínas entre as condições. C) *Volcano-test* realizado entre as condições estacionárias (FDR<0.05). Em rosa fase estacionária a 25°C e em verde fase estacionária a 34°C. D) “Heat Map” das proteínas reguladas (ANOVA, $p < 0.05$, com correção Benjamin-Hochberg) e aplicação de distância euclidiana, tendo pelo menos 2 valores válidos por grupo/espécie. As proteínas de maior expressão em uma espécie particular são representadas pela cor vermelha, a menos expressa pela cor verde, ausente em cinza, e em preto aquelas que não têm diferença na expressão.

A figura 17A mostra a relação de proteínas totais identificadas e as proteínas reguladas em cada espécie nas diferentes condições e como estas proteínas estão agrupadas em 8 famílias/grupos. Um total de 1494 proteínas foram identificadas em *L. (L.) amazonensis* apresentando diferenças entre as três condições. Um total de 2278 proteínas foram identificadas em *L. (V.) braziliensis* sendo apenas 51 (2,2%) reguladas entre a fase exponencial e estacionária a 25 °C sugerindo que para a espécie *L. (V.) braziliensis* não há diferenças significativas nas 3 condições, como já mostrado anteriormente. Um total de 2225 proteínas foram identificadas em *L. (L.) chagasi*, tendo diferenças entre as 3 condições, com destaque para 529 (23,7%) reguladas entre a fase exponencial e estacionária a 34 °C mostrando uma diferença maior entre essas duas condições. Estes resultados confirmam uma regulação específica de espécies na transição da fase exponencial para a fase estacionária.

Análises de ontologia gênica das famílias de proteínas de maior expressão nas proteínas reguladas entre as três condições dentro de cada espécie de *Leishmania* mostraram uma composição diferencial analisando as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (Figura 17B).

braziliensis não apresentou alterações. A análise mostra que para *L. (L.) chagasi* há uma predominância de proteínas ribossômicas seguidas por proteínas de choque térmico (HSPs), enquanto que para *L. (L.) amazonensis* as porcentagens de proteínas ribossômicas e choque térmico são as mesmas. (Figura 17B).

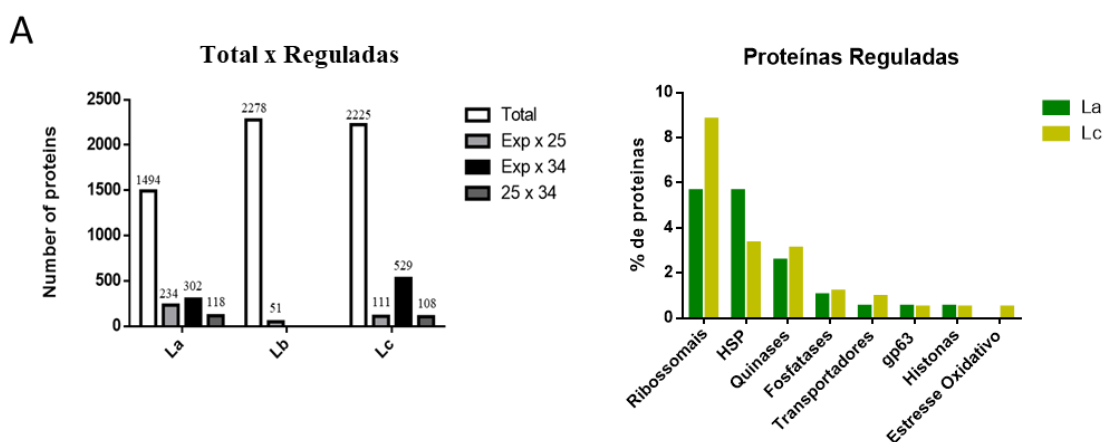


Figura 17: Comparação de proteínas totais identificadas e reguladas em *Leishmania* e ontologia gênica em fases de crescimento e mudança de temperatura. A) Comparação de proteínas identificadas e reguladas em *Leishmania* em fases exponenciais (Exp) e estacionárias (25,34). O número de proteínas reguladas foi obtido através de *Volcano-test* (FDR <0.05). B) Ontologia genética e expressão quantitativa na mesma espécie, comparando as três condições. As proteínas reguladas foram obtidas através da análise ANOVA, $p < 0,05$, com correção Benjamin-Hochberg e separadas por grupos. O filtro aplicado foi o nome das proteínas. Os valores no eixo estão em porcentagem.

Para validar candidatos específicos de proteína identificados por proteômica quantitativa, foi realizado ensaio de *western blotting* para α -tubulina, gp63 e HSP-70 na mesma espécie sob as três condições (Figura 18). A proteína α -tubulina foi identificada nas três condições de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*. Em ambas as espécies de *Leishmania* foi detectada uma expressão aumentada de α -tubulina nas fases estacionárias em comparação com a exponencial (Figura 18A). Além disso, uma alteração na temperatura de 25°C para 34 C induziu uma maior expressão de α -tubulina. A análise proteômica baseada em espectrometria de massas da α -tubulina de *L. (L.) amazonensis* revelou que a expressão diferencial de E9AGJ8 é mais expressa na fase exponencial em comparação à fase estacionária a 34°C, resultado inverso ao encontrado no *western blotting*, não tendo sido detectada na fase estacionária a 25°C. Nenhuma proteína α -tubulina regulada foi encontrada para *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) chagasi* (Figura 19A).

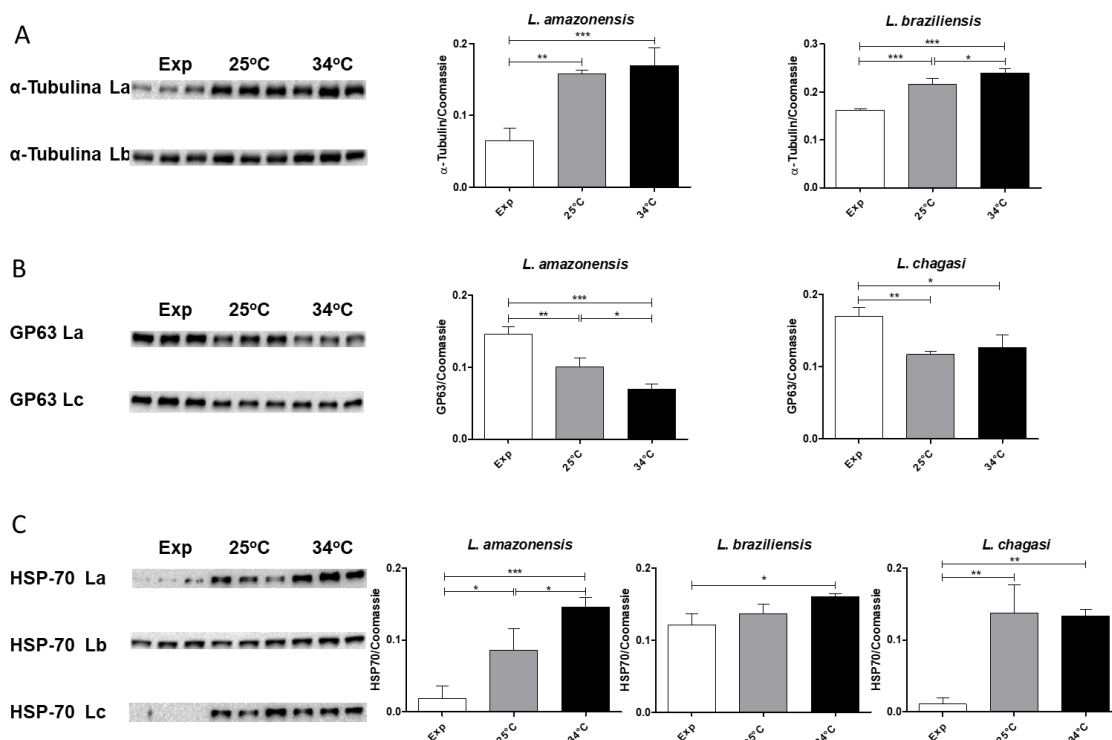


Figura 18: Análise comparativa das abundâncias de α -tubulina (A), GP63 (B) e HSP-70 (C) em extratos proteicos totais de promastigotas. Exponencial (Exp) e fase estacionária 1 (25°C) e 2 (34°C). O Western blotting foi realizado com triplicatas biológicas para *L. (L.) amazonensis* (La), *L. (V.) braziliensis* (Lb) e *L. (L.) chagasi* (Lc). Dados representados como média \pm desvio padrão. Valores foram considerados significativamente diferentes para pvalue <0,05 quando analisados por ANOVA unidirecional.

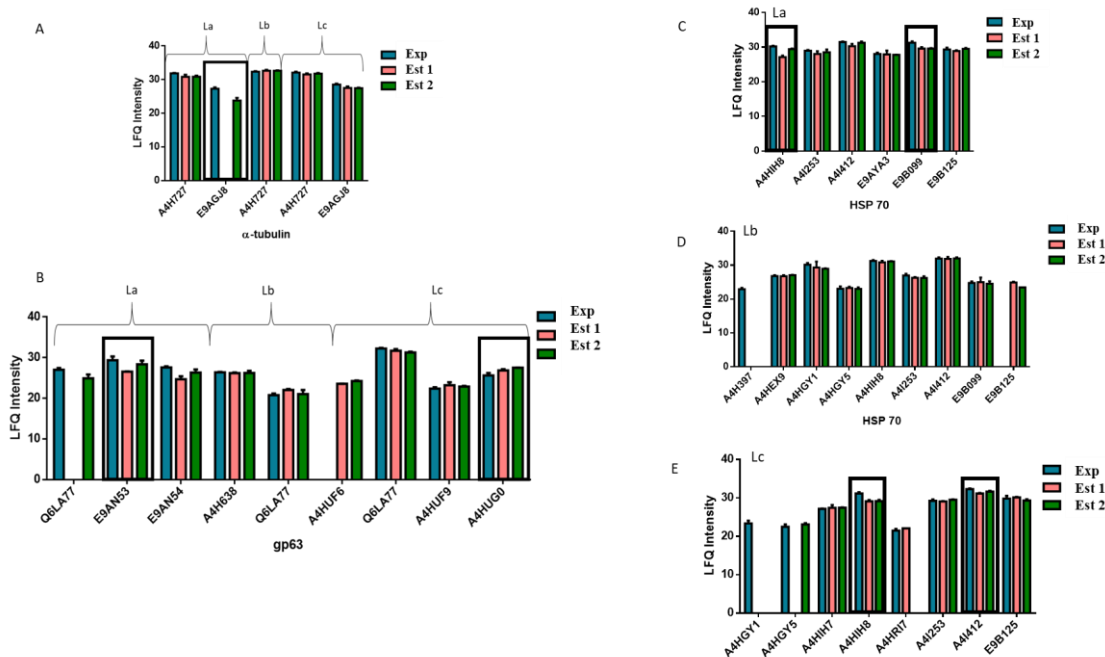


Figura 19. Proteínas α -tubulina (A), gp63 (B) e HSP-70: La)C, Lb)D e Lc)E, identificadas e reguladas por espécie em proteômica baseada em espectrometria de massas. As proteínas reguladas estão destacadas na caixa preta. Os resultados são expressos em Log₂ (LFQ Intensity).

A análise de *western blotting* da gp63 nas três condições para cada espécie de *Leishmania* mostrou uma diminuição na expressão da fase exponencial para a estacionária (**Figura 18B**). Em *L. (L.) amazonensis*, uma alteração térmica para 34°C mostrou uma expressão reduzida de gp63 em comparação com 25°C, enquanto que em *L. (L.) chagasi* os dois valores não foram estatisticamente diferentes. Nove proteínas gp63 foram identificadas por proteômica baseada em espectrometria de massas (**Figura 19B**). Q6LA77 (gp63) foi detectada nas três condições e nas três espécies de *Leishmania* enquanto as outras proteínas gp63 são específicas para cada condição. Em *L. (L.) amazonensis*, Q6LA77, E9AN53 e E9AN54 foram identificadas. E9AN54 foi encontrada regulada na fase exponencial em relação às fases estacionárias 25 e 34 (Exp>25=34), as demais não apresentaram regulação. Este resultado sugere que o anticorpo utilizado no *western blotting* possui um epítipo que reconhece uma sequência de aminoácidos semelhante à gp63 E9AN54, o que explicaria a compatibilidade dos resultados. Em *L. (V.) braziliensis*, Q6LA77 e A4H638 foram identificadas sem regulação. Em *L. (L.) chagasi*, foram identificadas Q6LA77, A4HUF6, A4HUF9 e A4HUG0. A proteína A4HUG0 foi encontrada regulada e está mais expressa na fase estacionária a 25°C e 34° em relação à fase exponencial (34=25>Exp) (**Figura 19B**).

A análise de *western blotting* da HSP-70 nas três condições experimentais para cada espécie revelou uma expressão aumentada da fase exponencial para a fase estacionária (**Figura 18C**). No entanto, foram observados níveis de regulação específicos da espécie, para *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* apresentando os maiores valores entre a fase exponencial e estacionária a 25°C. A mudança de temperatura de 25 para 34°C em parasitos de *Leishmania* na fase estacionária aumentou significativamente a expressão de HSP-70 em *L. (L.) amazonensis* (**Figura 18C**). A análise proteômica baseada na espectrometria de massas permitiu a identificação de doze proteínas HSP-70, sendo três reguladas (**Figura 19C, 19D e 19E**). Em *L. (L.) amazonensis*, a proteína HSP-70 A4HIH8 (LBRM_30_2420) é mais expressa na fase exponencial quando comparada às condições estacionárias (Exp>34>25). E9B099 (LMXM_28_2770) é mais expressa na fase exponencial em comparação com as duas condições estacionárias (Exp>25=34). Em *L. (L.) chagasi*, a A4HIH8 é mais expressa na fase exponencial em relação a duas condições estacionárias (Exp>25=34), demonstrando um perfil de HSP-70 específico para as duas espécies. A proteína A4I412 apresentou um perfil semelhante à A4HIH8 (**Figura 19E**). Estes dados confirmaram a maior expressão das proteínas HSP-70 na fase exponencial em comparação com as fases estacionárias.

4.3 Proteínas de Choque Térmico (HSPs)

Para estudar o efeito da temperatura nas células de *Leishmania*, foi avaliada a análise da função metabólica medida pelo ensaio colorimétrico de MTT revelou uma menor atividade com o aumento da temperatura de 25°C para 34°C. (**Figura 20A**). Essa redução foi maior na espécie *L. (V.) braziliensis* em comparação a *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*, sugerindo uma resposta diferencial ao estresse térmico (**Figura 20A**). A espécie *L. (L.) chagasi* apresentou maior resistência ao estresse térmico que *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Este resultado pode estar associado ao fato de *L. (L.) chagasi* ser uma das espécies causadoras da leishmaniose visceral, enquanto as outras duas espécies estão relacionadas a leishmaniose cutânea. A expressão de proteínas de choque térmico foi avaliada em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* nas três diferentes condições. Das 60 proteínas de choque térmico identificadas, 15 foram encontradas reguladas em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* com semelhanças e diferenças, conforme destacado nos perfis de expressão de HSPs (**Figura 20B e 20C**).

Na espécie *L. (L.) amazonensis*, 11 HSPs foram encontradas altamente expressas na fase exponencial. Estes incluem HSP60, 70, 78, 83-1, 90, 100 e DnaJ (**Figura 20B**). A fase exponencial de *L. (L.) amazonensis* mostrou 11 HSPs altamente expressas em comparação à fase estacionária a 25°C, incluindo HSP-70. Também é possível notar um grupo de choque térmico mais expresso na fase estacionária a 34°C em relação às fases exponencial e estacionária a 25°C. *L. (L.) chagasi* também apresenta a maioria de seus HSPs na fase exponencial, porém o número de HSPs que também são expressas na fase estacionária a 34°C em relação à fase estacionária a 25°C é maior quando comparada à *L. (L.) amazonensis*.

Com o intuito de validar a expressão de proteínas específicas de choque térmico na alteração de temperatura nas três espécies de *Leishmania*, a expressão de mRNA de HSP83-1 e HSP-70 foi avaliada por RT-qPCR. A expressão de mRNA de HSP83-1 foi aumentada nas três espécies após a mudança de temperatura sendo mais regulada em *L. (V.) braziliensis* (**Figura 20D**). A expressão de mRNA de HSP70 foi aumentada na *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* não tendo sido regulada em *L. (V.) braziliensis* (**Figura 20E**).

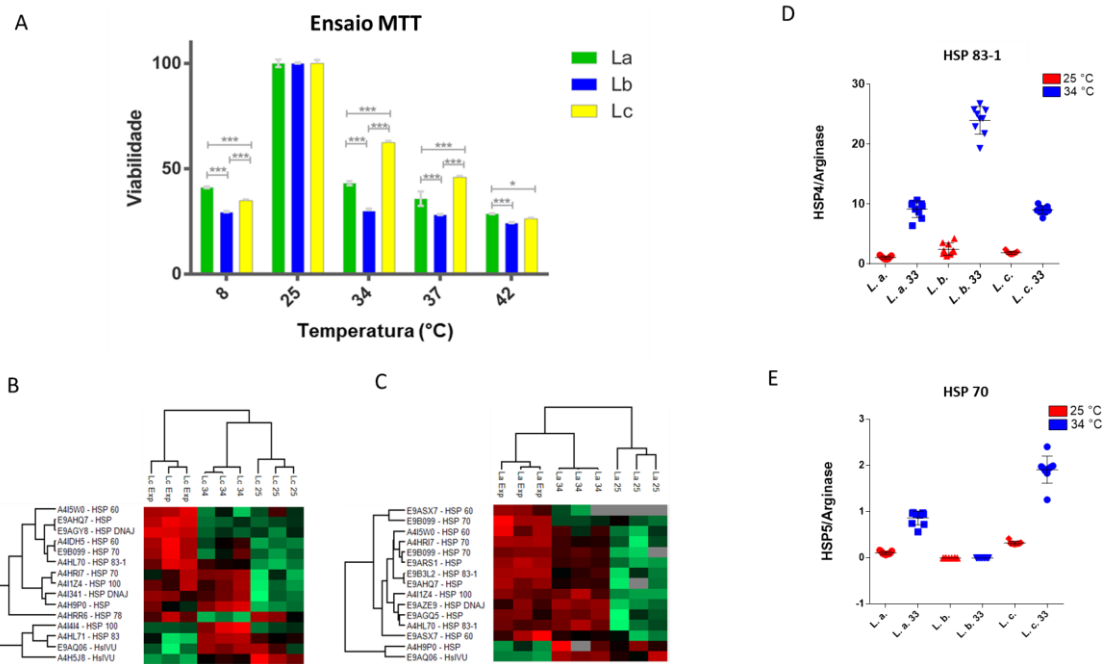


Figura 20: Viabilidade de promastigotas em fase estacionária de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* em diferentes temperaturas após 24 h. A análise de viabilidade foi feita pelo ensaio MTT. O teste estatístico realizado foi ANOVA (* $p < 0,05$; * $p < 0,001$). O gráfico é um teste representativo de cinco testes independentes. B, C: Proteínas de choque térmico e sua regulação nas espécies *L. (L.) amazonensis*(B) e *L. (L.) chagasi* (C) nas três condições. As proteínas mais expressas em uma determinada espécie são representadas pela cor vermelha, a menos expressas pela cor verde e ausentes em cinza. D, E: RT-qPCR para avaliar a expressão de choque térmico de HSP 83-1 e HSP-70.**

5. DISCUSSÃO

Abordagens proteômicas tem melhorado o entendimento atual da biologia de *Leishmania* (Sundar e Singh, 2018) Em particular, alterações moleculares baseadas em proteínas em diferentes estágios de desenvolvimento de *Leishmania*, interação *Leishmania*-hospedeiro, resistência a drogas, patogênese da doença e potenciais biomarcadores foram elucidados por proteômica (Sundar e Singh, 2018). Neste estudo, a modulação do proteoma de três espécies de *Leishmania* do Novo Mundo pertencentes aos subgêneros *Leishmania*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* e *Vianna*, *L. (V.) braziliensis* (Shaw, 1997) foi estudado.

Dentro do subgênero *Leishmania*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* pertencem aos complexos *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) donovani*, respectivamente. O resultado da doença em hospedeiros humanos é diferente para as três espécies, sendo *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* dermatrópicas provocando lesões cutâneas que podem desenvolver-se a mucocutâneas, enquanto *L. (L.) chagasi* é viscerotrópica, provocando resultados viscerais. A *L. (L.) amazonensis* é responsável por 8% das leishmanioses cutâneas simples e difusas no Brasil (Camara Coelho *et al.*, 2011) enquanto a *L. (V.) braziliensis* é uma das principais causas de leishmaniose cutânea nas Américas (Grimaldi e Tesh, 1993). O resultado da doença varia de lesões cutâneas autorregenerantes a lesões mucosas agressivas (Saravia *et al.*, 1985; Marsden, 1986). A variabilidade genética, fenotípica e clínica associada à *L. (V.) braziliensis* foi demonstrada em várias cepas isoladas em diferentes regiões geográficas (Saravia *et al.*, 1998; Cupolillo *et al.*, 2003).

O resultado clínico da leishmaniose é impulsionado pela diferença entre as espécies em conjunto com a genética do hospedeiro e resposta imune e embora a resposta imune do hospedeiro tenha feito grandes avanços frente a diferentes espécies de *Leishmania*, os fatores que contribuem para essas diferenças são amplamente desconhecidos (Chang e Mcgwire, 2002; Rossi e Fasel, 2018), embora diversas mudanças morfológicas tenham sido observadas. As espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo *L. mexicana* estão alojadas em grande número dentro de um grande vacúolo parasitóforo dentro dos macrófagos, enquanto os complexos *L. donovani* e *L. braziliensis* residem intracelularmente dentro de pequenos vacúolos parasitóforos que tipicamente contêm um único parasito (Real *et al.*, 2008; Real e Mortara, 2012). Além disso a mudança de estágio de promastigotas para promastigotas metacíclicos durante o desenvolvimento da *Leishmania* no flebotomíneo incluem diversas modificações para preparar o parasito para ser transmitido a um hospedeiro mamífero.

As características moleculares (genes, proteínas e metabólitos) têm sido investigadas

para entender as causas de suas peculiaridades clínicas.

Nesse estudo foi aplicada uma abordagem experimental baseada em proteômica quantitativa em larga escala e ensaios funcionais ortogonais foi implementado para cumprir os objetivos relatados. A viabilidade celular das três espécies nas três condições foi avaliada e nos forneceu a base para observar as diferenças proteômicas devido ao remodelamento das vias de sinalização intracelular em vez de morte celular. A modulação específica de classes de proteínas das espécies de *Leishmania* selecionadas durante a fase de crescimento (fase exponencial, estacionária) e mudança de temperatura (mudança de 25° C para 34° C) foi observada.

O primeiro objetivo deste estudo foi comparar as três espécies de *Leishmania*, a fim de identificar diferenças no seu proteoma correlacionadas com o seu resultado fisiopatológico. Um total de 7449 proteínas foi identificado considerando as três espécies e as três condições de crescimento. Até onde sabemos, esse número de proteínas identificadas representa o maior conjunto de dados reportados até o momento. Analisando o número total de proteínas identificadas para cada espécie de *Leishmania* nas três condições, *L. (V.) braziliensis* apresentou o maior número de proteínas 3135, 2208 e 4414 nas três condições, seguido de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis*. O maior número de proteínas identificadas para as três espécies estava na fase exponencial, seguido pela fase estacionária a 34° C, e estacionária a 25° C. O menor número de peptídeos e proteínas para a espécie *L. (L.) amazonensis*, nas três condições, pode ter sido causado pelo uso do banco de dados de *L. mexicana* disponível no banco de dados público UNIPROT.

Cerca de 24.000 proteínas das espécies *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* foram utilizadas para a análise e o mesmo banco de dados foi utilizado para pesquisar os dados de espectrometria de massa para as três espécies e nas três condições. As três espécies citadas acima foram selecionadas para representar o complexo de espécies de cada espécie estudada. Um banco de dados de proteínas para *L. (L.) amazonensis* não foi encontrado no UNIPROT. Embora o banco de dados TriTrypDB contenha uma lista de proteínas de *L. (L.) amazonensis*, esses dados são de ESTs e ORFs e não estão bem anotados de acordo com os critérios utilizados neste estudo. Devido à alta similaridade de sequências de proteínas entre as três espécies, vários grupos de proteínas foram identificados com base em peptídeos compartilhados. No entanto, várias proteínas foram identificadas de forma única em cada espécie específica de *Leishmania*. A identificação dessas proteínas “únicas” pode ser associada a diferenças na sequência de aminoácidos entre as três espécies permitindo a identificação de proteínas específicas baseadas em sequências peptídicas únicas.

Um dos primeiros relatos usando abordagens proteômicas para o estudo da *Leishmania* explorou a eletroforese 2D de promastigotas de *Leishmania* do novo mundo na fase exponencial pertencente ao complexo de espécies *L. (L.) mexicana* e *L. (V.) braziliensis* (Saravia *et al.*, 1984). Um padrão de proteína diferente foi observado para os dois complexos com diferenças menores dentro do mesmo complexo, indicando um mapa de proteoma específico da espécie (Saravia *et al.*, 1984). A comparação proteômica de promastigotas de *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum* foi realizada usando 2DE combinado com LC-MS / MS e os dados brutos foram pesquisados em relação ao banco de dados de proteínas *L. (L.) major* (Hajjarian *et al.*, 2015). As proteínas reguladas estavam envolvidas no citoesqueleto, estresse oxidativo, proteólise e transporte. A análise de agrupamento baseada na expressão diferencial das proteínas mostrou que as duas espécies cutâneas agrupadas se separaram para o visceral, sugerindo uma modulação do proteoma específica para o desfecho da doença, embora o estágio promastigota tenha sido analisado (Hajjarian *et al.*, 2015). Outro estudo analisou o proteoma de membrana de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum* nos estágios promastigota e amastigota. Dentro das proteínas reguladas, a gp63 foi encontrada mais regulada no estágio promastigota nas duas espécies, enquanto a proteína-11 da membrana cinetoplastidária sofreu maior regulação no estágio promastigota em *L. (L.) infantum* sendo menos regulada em *L. (L.) mexicana* (Lynn *et al.*, 2013). Estes dados mostram uma modulação específica da espécie do proteoma durante o desenvolvimento do parasito.

Analisando a porcentagem de proteínas reguladas em relação ao total, detectamos até 15% de proteínas reguladas. Em outros estudos, a transição de promastigota para amastigota revelou que de 5-10% do proteoma é diferencialmente regulado (Acestor *et al.*, 2002; El Fakhry *et al.*, 2002; Bente *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2017). Por isso, os dados aqui apresentados estão de acordo com a literatura.

Estudos proteômicos anteriores de *Leishmania spp* em transição de diferentes estágios da vida foram relatadas. Uma análise proteica quantitativa ao longo do tempo em *Leishmania donovani* durante a diferenciação axênica de promastigota a amastigota revelou uma menor expressão de funções anabólicas, tais como a tradução proteica e maior expressão de processos catabólicos, tais como ciclo TCA e β -oxidação (Rosenzweig *et al.*, 2008). Em condições axênicas, os promastigotas são submetidos a mudanças drásticas no pH (de 7 a 5) e temperatura (de 25° C a 37° C). Essas condições reproduzem as características do ambiente lisossômico de amastigotas residentes dentro dos macrófagos. Curiosamente, nas primeiras 10 horas de exposição do promastigota, poucas proteínas mudaram significativamente, indicando um

remodelamento gradual e regulado das vias intracelulares ao nível da proteína (Rosenzweig *et al.*, 2008). A análise dos transcritos revelou uma modulação precoce em comparação com o nível de proteína nas mesmas condições experimentais (Lahav *et al.*, 2011). No presente estudo, a mudança de temperatura de 25° C para 34° C foi investigado mantendo o pH 7,4. A mudança da temperatura é importante para isolar o efeito da temperatura na modulação do proteoma de *Leishmania* como discutido abaixo.

Outro estudo utilizando espectrometria de massas na identificação de proteínas de *Leishmania* identificou 3700 proteínas em *L. major* (Drummelsmith *et al.*, 2003). Estudos com *L. (L.) donovani* utilizando gel bidimensional e MALDI-TOF também foram realizados. Em um as proteínas solúveis foram analisadas para identificar potenciais antígenos (Gupta *et al.*, 2007), enquanto o outro estudo identificou 132 proteínas de isolados clínicos (Kumar *et al.*, 2015). Também há estudos para identificar o fosfoproteoma de *Leishmania*. Dois estudos utilizando promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) donovani* identificaram 171 proteínas (Morales *et al.*, 2010) e 282 (Tsigankov *et al.*, 2013). Nosso estudo expande o repertório de proteínas identificadas e quantificadas nas espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* oferecendo um importante banco de dados para a comunidade científica.

O segundo objetivo está relacionado com a compreensão das diferenças entre promastigotas na fase exponencial e estacionária nas três espécies de *Leishmania*. De fato, um conhecimento mais profundo sobre os estágios de desenvolvimento no vetor de flebotomíneos. Até onde sabemos, não há estudos publicados sobre a análise proteômica de *Leishmania spp.* comparando as fases de crescimento exponencial e estacionário. Entretanto, estudos metabolômicos em *L. (L.) donovani* e *L. (L.) major* foram relatados. Em um estudo, utilizando análise metabolômica baseada na espectrometria de massa não-alvo, a transição da fase exponencial para a fase estacionária induziu mudanças nas classes lipídicas específicas, como glicerofosfolipídios, esfingolipídeos e glicerolipídeos, aumentando sua expressão da fase exponencial para a estacionária. Em outro estudo, utilizando análise de metabolômica baseada em RMN 1H, a transição da fase exponencial para a fase estacionária induziu mudanças em metabólitos específicos, como ácido citracônico, ácido isopropílico, L-leucina, ornitina, ácido caprílico, ácido cáprico e ácido acético (Silva *et al.*, 2011; Arjmand *et al.*, 2016). Também foi encontrado um artigo que descreve uma modificação da estrutura de um lipofosfoglicanos durante a diferenciação de *L. (L.) major* do estágio promastigota procíclico para promastigota metacíclico (Mcconville *et al.*, 1992).

Além disso, a modulação da superfície do proteoma durante a transição da fase

exponencial para a fase estacionária em *L. (L.) chagasi* mostrou uma resistência aumentada à lise mediada por complemento. De fato, os parasitos de *Leishmania* na fase exponencial modificam as características morfológicas após a incubação com soro humano normal, induzindo a deposição das proteínas C3, C5 e C9 na membrana da célula parasita (Ramer-Tait *et al.*, 2012). Em nosso estudo, as três espécies de *Leishmania* do Novo Mundo mostraram regulação de proteínas durante a transição de exponencial para a estacionária. Em particular, *L. (L.) amazonensis* apresentou o maior percentual de proteínas reguladas (15%) seguido de *L. (L.) chagasi* (5%) e *L. (V.) braziliensis* (2%). Esta regulação específica de espécie durante a transição exponencial para estacionária indica que *L. (L.) amazonensis* é mais influenciada do que as outras espécies durante o desenvolvimento no vetor. A discussão detalhada sobre α -tubulina, gp63 e HSPs nesta transição é fornecida abaixo.

O terceiro objetivo está relacionado à compreensão da plasticidade molecular das três espécies submetidas ao estresse térmico. Para isolar o efeito da temperatura nos parasitos, promastigotas de fase estacionária cultivadas a 25° C foram incubadas a 34° C durante um dia. O estresse térmico induziu uma mudança morfológica nas células do parasito (**Figura 3**). De fato, o corpo do parasito se torna mais redondo e um flagelo menor é observado na incubação em temperatura mais alta.

A temperatura é um dos fatores desencadeantes do desenvolvimento do parasito, permitindo que ele se adapte ao hospedeiro mamífero. A resposta ao choque térmico montada por parasitos ajuda a manter o equilíbrio biológico homeostático e sua sobrevivência. Proteínas de choque térmico são um dos principais intervenientes nesta resposta (Folgueira e Requena, 2007). A análise proteômica das três condições para cada espécie mostrou um maior número de proteínas para a fase exponencial seguido da fase estacionária a 34° C e da fase estacionária a 25° C. A diminuição do número de proteínas entre a fase exponencial e estacionária a 25° C está relacionada com a transição de uma fase proliferativa para uma fase quiescente. Curiosamente, parasitos de *Leishmania* coletados no 6° dia de cultivo e incubados por 24 horas a 34°C aumentaram o número de proteínas detectadas mostrando uma modulação do proteoma intracelular ditada pelo deslocamento da temperatura. Comparando a porcentagem de proteínas reguladas entre as fases estacionárias a 25° C e a 34° C, *L. (L.) amazonensis* apresentou o maior número de proteínas reguladas em relação a *L. (L.) chagasi*. *L. (V.) braziliensis* não mostrou qualquer regulação sobre o estresse térmico. Este resultado mostra mais uma vez a resposta específica da espécie ao estresse térmico. Descrição detalhada de α -tubulina, gp63 e HSPs sobre o estresse térmico fornecido abaixo.

Dentro do terceiro objetivo investigamos as famílias de proteínas α -tubulina, gp63 e HSPs nas diferentes condições. Essas famílias foram escolhidas devido à sua importância na morfologia e virulência do parasito.

5.1 Tubulina

O citoesqueleto de tripanossomatídeos é responsável por manter a forma do parasito através do ciclo de vida, divisão celular e transporte de carga intracelular (Sherwin e Gull, 1989). O citoesqueleto, uma rede interconectada de polímeros filamentosos e proteínas reguladoras é composto de microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários. Os microtúbulos, a maior estrutura e principal componente do citoesqueleto, são constituídos de subunidades α e β -tubulina montadas em protofilamentos lineares (Rochlin *et al.*, 1999). Os parasitos são expostos a diversas alterações osmóticas, desde flutuações extremas na força osmótica do intestino médio do vetor até fagolisossomos ácidos e a reorganização do citoesqueleto permite que controlem sua forma.

Neste estudo, investigou-se a expressão da proteína α -tubulina entre as diferentes espécies de *Leishmania* e as condições de crescimento e mudança de temperatura. Duas proteínas α -tubulinas foram identificadas por espectrometria de massa em nossa análise, E9AGJ8 e A4H727. E9A6J8 apresentou regulação na fase exponencial, sendo mais expressa na espécie *L. (L.) chagasi* e menos expressa na espécie *L. (L.) amazonensis*. Esta proteína não foi identificada em espécies de *L. (V.) braziliensis*. Para a fase estacionária a 25° C, nenhuma α -tubulina regulada foi identificada, embora β -tubulina, como A4HLD6, tenha sido encontrada mais expressa em *L. (L.) chagasi* e menos expressa em *L. (V.) braziliensis*. Para a fase estacionária a 34°C, E9A6J8 apresentou o mesmo comportamento da fase exponencial, enquanto a α -tubulina AH4727 foi mais expressa em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* em relação a *L. (L.) amazonensis* (Lb> Lc>La). A análise de *western blotting* mostrou uma maior expressão de α -tubulina na fase estacionária a 34 ° C em comparação com as outras condições de crescimento e em *L. (V.) braziliensis* em comparação com as outras espécies. Estes resultados estão de acordo com a α -tubulina (AH4727), cuja maior expressão foi encontrada em *L. (V.) braziliensis*.

A organização genômica dos genes da α -tubulina em *L. (V.) braziliensis* é diferente em comparação aos genomas de *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum*, com uma característica comum de várias cópias gênicas arranjadas em conjunto (Ramirez *et al.*, 2013). De fato, o gene da α -tubulina em *L. (L.) major* está localizado em um locus no cromossomo 13 com 12 cópias com as mesmas ORFs arranjadas em série (Ivens *et al.*, 2005). Já o gene da α -tubulina em *L.*

(*L.*) *infantum* existe em dois locais no cromossomo 13, sendo um com uma única cópia e o outro com uma cópia completa e truncada. O gene da α -tubulina em *L. (V.) braziliensis* existe em dois *loci* no cromossomo 13 e 29. O locus no cromossomo 13 contém duas cópias completas e o gene *α -tubulina-like*. O locus no cromossomo 29 contém uma cópia com uma forma truncada. Em relação aos estágios de *Leishmania* o nível de mRNA da tubulina mostrou ser mais alto em promastigotas em comparação à forma amastigota. Isto foi observado em *L. enrietti* e em *L. (L.) major* (Landfear e Wirth, 1984; Leifso *et al.*, 2007). No entanto, em *L. (L.) mexicana* não foi observada diferença entre os estágios promastigota e amastigota (Fong e Chang, 1986).

Em *Trypanosoma cruzi*, um possível mecanismo de regulação da meia-vida do mRNA da tubulina é feito por *feedback* negativo pela síntese da proteína tubulina livre (Da Silva *et al.*, 2006). Além disso, foi observada uma regulação dependente da temperatura para o mRNA de α -tubulina. Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* incubadas a 35° C mostraram diminuição da expressão de mRNA de α -tubulina (Ramirez *et al.*, 2013). Esta tendência tem sido demonstrada ao nível da proteína com diminuição da expressão de tubulina durante a transição da fase de vida promastigota para amastigota (Fong e Chang, 1981; Fong *et al.*, 1984; Fong e Chang, 1986). Os dados obtidos nesse estudo mostram uma regulação da α -tubulina dependente da espécie da *Leishmania* e da temperatura.

5.2 GP63

Proteases desempenham um papel importante em vários processos biológicos da *Leishmania* como a citoaderência, virulência, invasão e disseminação para os tecidos do hospedeiro, sobrevivência nos diferentes ambientes dos hospedeiros e inibição do sistema imune (North e Coombs, 1981; Coombs, 1982; Klemba e Goldberg, 2002). Cisteína, serina, aspártico e metaloproteases foram mapeadas no genoma de *Leishmania* e identificadas ao nível da proteína (Silva-Almeida *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2018). A gp63, também conhecida como leishmanolisina, ou protease superficial promastigota, é a protease superficial mais abundante em várias *Leishmania spp.* (Etges *et al.*, 1986; Yao *et al.*, 2003). É uma metaloprotease dependente de zinco com ampla especificidade de substrato clivando múltiplas proteínas intracelulares, alterando o envelope nuclear do hospedeiro e degradando proteínas de matriz extracelular (McGwire *et al.*, 2003; Halle *et al.*, 2009). Além disso, gp63 possui funções importantes como fator de virulência e fixação de complemento (Brittingham *et al.*, 1995; Olivier *et al.*, 2012).

A gp63 é expressa em estágios de vida promastigota e amastigota (Frommel *et al.*, 1990). No entanto, os resultados conflitantes têm sido obtidos utilizando anticorpos criados contra diferentes epítomos (Chang *et al.*, 1986; Bordier, 1987).

Múltiplas cópias de genes de *Leishmania* gp63 são relatadas em conjunto em um único local do cromossomo (Button e McMaster, 1988; Button *et al.*, 1989) e possui um grande polimorfismo dentro da mesma espécie (Medina *et al.*, 2016), o que pode explicar a diferença entre os resultados obtidos nesse estudo pelo banco de dados e o *western blotting*. A análise da atividade proteolítica das três espécies de *Leishmania* nas três condições revelou um padrão específico de protease por cada espécie e condição (**Figura 13**).

Os primeiros relatos do perfil zimográfico de cinco cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de pacientes na Colômbia e no Brasil com diferentes desfechos clínicos revelaram proteínas de 50-125kDa (Cuervo *et al.*, 2006). Os extratos promastigotas e seus sobrenadantes foram feitos contra gelatina de peixe. Estas proteases foram inibidas por 1,10-fenantrolina indicando uma atividade de metaloprotease (Cuervo *et al.*, 2006).

O padrão de *L. (V.) braziliensis* mostrou quatro bandas principais entre 60 e 80kDa. As bandas de zimografia de menor peso molecular a 63kDa de *L. (V.) braziliensis* foram encontradas aumentadas na fase estacionária a 34° C (**Figura 13C**). Estes resultados confirmam a expressão diferencial e a atividade da gp63 em *Leishmania spp.* em diferentes condições. Junto com a α -tubulina, a regulação da família gp63 representa outro ponto crítico molecular importante para investigação como possível alvo terapêutico.

5.3 HSPs

As HSPs, proteínas de choque térmico, apresentaram expressão diferencial entre as diferentes espécies de *Leishmania* e condições de crescimento. As HSPs são proteínas altamente conservadas e estão presentes em todos os tipos de células transcritas constitutivamente e são reguladas no nível pós-transcricional (Requena *et al.*, 2015).

Suas estruturas primárias e massa molecular os dividem em diferentes famílias como HSP110, HSP104 / 100, HSP90 / 83, HSP70, HSP60, HSP40, HSP10 e pequenas proteínas de choque térmico. Eles têm como funções interagir com diversas proteínas controlando sua maturação, ativação, translocação e degradação (Feder e Hofmann, 1999; Hombach *et al.*, 2014).

A família de choque térmico 70 (HSP70) é numerosa e diversificada em *Leishmania spp.* No entanto, muito pouco se sabe sobre o controle e o papel desses genes (Hombach *et al.*,

2014). Sabe-se que a HSP 70 juntamente com a HSP 90 e a HSP 40 fazem parte do complexo envolvido na dobragem, maturação e montagem corretas dos peptídeos (Johnson, 2012). A família de proteínas de choque térmico 90, também conhecida como HSP-83, desempenha um papel importante no controle da vida do parasito. A HSP-83 é uma chaperona molecular dependente de ATP. Esta proteína não está envolvida na proteção do parasito contra estresses ambientais, embora haja um aumento de sua expressão em tensões térmicas, sendo também abundante em condições normais de crescimento, tanto na proliferação do parasito no flebotomíneo (promastigota) como no estágio intracelular do mamífero (amastigota). Elas também participam da tradução do sinal como efetor em vias de fosforilação (Requena *et al.*, 2015). Várias HSPs foram encontradas reguladas entre os diferentes estágios de *Leishmania* e estresse de térmico. Em particular, a HSP70 mostrou maior expressão na fase exponencial usando proteômica baseada em espectrometria de massa. O *western blotting* mostrou maior expressão na fase estacionária e aumentou ainda mais com a mudança de temperatura. Esta regulação específica de HSPs pertencentes a diferentes famílias, detectada por proteômica quantitativa, abre novas oportunidades para estudar sua influência como potenciais alvos terapêuticos.

Para finalizar é importante mencionar que algumas discrepâncias entre *western Blotting* e os dados proteômicos foram observadas, especialmente para a proteína α -tubulina. A quantificação de proteínas baseadas em anticorpos em diferentes condições é uma técnica bem estabelecida que tem sido aplicada mundialmente em diferentes organismos. Um dos maiores desafios na análise de *western blotting* é a especificidade do anticorpo. Esta questão torna-se mais importante para a análise de proteínas pertencentes a famílias com múltiplos membros com diferenças sutis de sequência. Além disso, a comparação de diferentes espécies do mesmo organismo representa outro desafio relacionado às diferenças específicas da espécie na sequência proteica baseada em relações filogenéticas.

Para *Leishmania*, o número e a qualidade de anticorpos disponíveis são escassos em comparação com humanos e camundongos. Na maioria dos casos, esses anticorpos são pouco caracterizados e o conhecimento de seu antígeno é privado e não está disponível. Além disso, na maioria dos casos, uma amostra de referência para testar a especificidade do anticorpo não está disponível.

A quantificação de proteínas baseadas em espectrometria de massa *bottom-up* utilizada neste manuscrito é baseada na identificação e quantificação de peptídeos que permitem inferir a abundância de proteínas. Desvantagens relacionadas a esta técnica resultam da digestão

incompleta de proteínas, reprodutibilidade da corrida e inferência de proteínas (Zhang *et al.*, 2013). No modo de descoberta, esta análise permite o monitoramento simultâneo de milhares de peptídeos que são identificados e quantificados de forma confiável. Este método permite a identificação e quantificação de vários membros de famílias de proteínas em uma única corrida com múltiplos peptídeos / proteínas. Um dos desafios comuns entre os métodos baseados em *western blotting* e espectrometria de massa é a presença, diversidade e modulação de modificações pós-traducionais. Embora os anticorpos específicos de PTM não estejam disponíveis, especialmente para organismos não estudados, e exijam conhecimento prévio sobre o local de modificação, a proteômica baseada em espectrometria de massa avançou nosso entendimento sobre os locais e modulação de PTM. A complementaridade entre as duas técnicas torna-as uma abordagem interessante para todos os laboratórios de pesquisa. No entanto, os métodos baseados em espectrometria de massa podem fornecer uma detecção específica de proteoforma com alta confiança, como mostrado neste manuscrito (Aebersold *et al.*, 2013).

6. CONCLUSÃO

O proteoma quantitativo de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* detalhado neste estudo destaca as diferenças entre as três espécies que podem estar ligadas à sua proximidade filogenética, semelhanças fenotípicas e patológicas. As diferenças proteômicas identificadas para a transição da fase de crescimento e o estresse térmico consolidam o conceito de uma plasticidade proteômica das três espécies que é remodelada sobre estímulos externos induzidos pela pressão seletiva do hospedeiro sobre o parasito. Muitas das proteínas identificadas neste estudo podem estar associadas aos processos biológicos importantes para a sobrevivência e infectividade do parasito. Dentro dessas proteínas, α -tubulina, gp63 e HSPs mostraram um padrão específico que merece mais investigação. Proteoformas diferentes pertencentes a cada família de proteínas apresentaram um padrão de expressão específico nas espécies e condições analisadas. Seguindo uma pesquisa bibliográfica sobre os estudos proteômicos em parasitos de *Leishmania* em diferentes condições, está claro que α -tubulina, gp63 e HSPs, estão entre as proteínas mais comumente identificadas que foram propostas como alvos de drogas e candidatos a vacinas. A constante identificação destas proteínas pode estar associada à sua abundância dentro das células de *Leishmania* e / ou suas importantes funções. Mais estudos são necessários para preencher essa lacuna de conhecimento.

7. REFERÊNCIAS

_____. Changes in tubulin mRNAs during differentiation of a parasitic protozoan *Leishmania mexicana*. **Ann N Y Acad Sci**, v. 466, p. 129-31, 1986. ISSN 0077-8923

_____. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 347-55, Sep 15 2016. ISSN 1476-4687

ACESTOR, N. et al. Establishing two-dimensional gels for the analysis of *Leishmania* proteomes. **Proteomics**, v. 2, n. 7, p. 877-9, Jul 2002. ISSN 1615-9853

ADLER, S. *Leishmania*. *Advances in parasitology*, v. 2, p. 35–96, 1964.

AEBERSOLD, R.; BURLINGAME, A. L.; BRADSHAW, R. A. Western blots versus selected reaction monitoring assays: time to turn the tables? **Mol Cell Proteomics**, v. 12, n. 9, p. 2381-2, Sep 2013. ISSN 1535-9484

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, Mar 13 2003. ISSN 0028-0836

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected tropical diseases*, 2016.

AKILOV, O. E; KHACHEMOUNE, A.; HASAN, T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, v. 46, n. 2, p. 132-42, Feb 2007. ISSN 0011-9059.

ALVAR, J; VÉLEZ, I. D; BERN, C; HERRERO, M; DESJEUX, P; CANO, J; JANNIN, J; DEN BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 2012.

ALVES, C. R. et al. Understanding serine proteases implications on *Leishmania* spp lifecycle. **Exp Parasitol**, v. 184, p. 67-81, Jan 2018. ISSN 0014-4894.

AOKI, J. I. et al. RNA-seq transcriptional profiling of *L. (L.) amazonensis* reveals an arginase-dependent gene expression regulation. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 10, p. e0006026, Oct 2017. ISSN 1935-2727.

ARJMAND, M. et al. Metabolomics-Based Study of Logarithmic and Stationary Phases of Promastigotes in *Leishmania major* by 1H NMR Spectroscopy. **Iran Biomed J**, v. 20, n. 2, p. 77-83, 2016. ISSN 1028-852x.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. **Int J Anal Chem**, v. 2012, p. 282574, 2012. ISSN 1687-8779

BAÑULS, A.L; HIDE, M; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*. 2007; 64:1–109.

BARBOSA, E. B; VIDOTTO, A; POLACHINI, G. M; HENRIQUE, DE MARQUI, A. B. T; TAJARA, E. H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev Assoc Med Bras*, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.

BENTE, M. et al. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. ***Proteomics***, v. 3, n. 9, p. 1811-29, Sep 2003. ISSN 1615-9853

BIAGI, F. Algunos comentarios sobre leishmaniasis y sus agentes etiológicos, *Leishmania tropica mexicana*, nueva sub-especies. *Medicina (Mex)* 33: p. 385-396, 1953.

BIEGEL, D.; TOPPER, G.; RABINOVITCH, M. *Leishmania mexicana*: temperature sensitivity of isolated amastigotes and of amastigotes infecting macrophages in culture. ***Exp Parasitol***, v. 56, n. 3, p. 289-97, Dec 1983. ISSN 0014-4894

BERN, C; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 2, n. 10, p. e313, 2008. ISSN 1935- 2735.

BRAY, R. S.; ASHFORD, R. W.; BRAY, M. A. The parasite causing cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 67, n. 3, p. 345-8, 1973.

BORDIER, C. The promastigote surface protease of *Leishmania*. ***Parasitol Today***, v. 3, n. 5, p. 151-3, May 1987. ISSN 0169-4758 (Print) 0169-4758.

BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. ***J Immunol***, v. 155, n. 6, p. 3102-11, Sep 15 1995. ISSN 0022-1767

BUTTON, L. L.; MCMASTER, W. R. Molecular cloning of the major surface antigen of leishmania. ***J Exp Med***, v. 167, n. 2, p. 724-9, Feb 1 1988. ISSN 0022-1007

BUTTON, L. L. et al. Genes encoding the major surface glycoprotein in *Leishmania* are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. ***Mol Biochem Parasitol***, v. 32, n. 2-3, p. 271-83, Jan 15 1989. ISSN 0166-6851

CALLAHAN, H. L. et al. *Leishmania* spp: temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for tropism in vivo. ***Exp Parasitol***, v. 84, n. 3, p. 400-9, Dec 1996. ISSN 0014-4894

CAMARA COELHO, L. I. et al. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. ***Parasitol Res***, v. 108, n. 3, p. 671-7, Mar 2011. ISSN 0932-0113.

CATHERMAN, A. D.; SKINNER, O. S.; KELLEHER, N. L. Top Down proteomics: facts and perspectives. ***Biochem Biophys Res Commun***, v. 445, n. 4, p. 683-93, Mar 21 2014. ISSN 1090-2104

CASSAGNE, C. PRATLONG, F; JEDDI, F; BENIKHLEF, R; AOUN, K; NORMAND, A.C; FARAUT, F; BASTIEN, P; PIARROUX, R. Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*, v. 20, n. 6, p. 551-7, Jun 2014. ISSN 1469-0691.

CHAIT, B. T. Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down? **Science**, v. 314, p. 65-66, 2006-10-06 00:00:00 2006.

CHANG, C. S. et al. Expression and size heterogeneity of a 63 kilodalton membrane glycoprotein during growth and transformation of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 18, n. 2, p. 197-210, Feb 1986. ISSN 0166-6851 (Print) 0166-6851.

CHANG, K. P.; MCGWIRE, B. S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biol Dis**, v. 1, n. 1, p. 1, May 20 2002. ISSN 1475-9292 (Print) 1475-9292.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 11, p. 873-82, Nov 2007. ISSN 1740-1534

CHAUDHURI, G. et al. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. **J Biol Chem**, v. 264, n. 13, p. 7483-9, May 5 1989. ISSN 0021-9258

CLARK, A. E; KALETA, E. J; ARORA, A; WOLK, D.M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the rout clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, v. 26, n. 3, p. 547-603, Jul 2013. ISSN 1098-6618.

COX, J.; HEIN, M. Y.; LUBER, C. A.; PARON, I.; NAGARAJ, N.; MANN, M. Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 13, n. 9, p. 2513–2526, set. 2014

COOMBS, G. H. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. **Parasitology**, v. 84, n. 1, p. 149-55, Feb 1982. ISSN 0031-1820

CUERVO, P. et al. A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. **Parasitology**, v. 132, n. Pt 2, p. 177-85, Feb 2006. ISSN 0031-1820

CULHA, G; AKYA, I; YILDIZ ZEYREK, F; KURT, O; GÜNDÜZ, S; ÖZENSOY TÖZ, S; ÖSTAN, I; CAVUS, I; GÜLKAN, B; KOCAGÖZ, T; ÖZBEL, Y; ÖZBILGIN, A. Leishmaniasis in Turkey: Determination of *Leishmania* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Iran J Parasitol*, v. 9, n. 2, p. 239-48, Apr-Jun 2014. ISSN 1735-7020.

CUPOLILLO, E. et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 7, p. 3126-32, Jul 2003. ISSN 0095-1137

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 50, n. 3, p. 296–311, 1994.

CUPOLILLO, E; MEDINA-ACOSTA, E; NOVES, H; MOMEN, H. A; GRIMALDI, G. Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*, 2000.

DA SILVA, R. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; TEIXEIRA, S. M. Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol**, v. 36, n. 1, p. 87-96, Jan 2006. ISSN 0020-7519

DE JESUS, J. B.; MESQUITA-RODRIGUES, C.; CUERVO, P. Proteomics advances in the study of *Leishmania* parasites and leishmaniasis. **Subcell Biochem**, v. 74, p. 323-49, 2014. ISSN 0306-0225

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. ISSN 1535-9476

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, Aug 2002. ISSN 1615-9853

ETGES, R.; BOUVIER, J.; BORDIER, C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. **J Biol Chem**, v. 261, n. 20, p. 9098-101, Jul 15 1986. ISSN 0021-9258

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annu Rev Physiol**, v. 61, p. 243-82, 1999. ISSN 0066-4278

FIELD, V; GAUTRET, P; SCHLAGENHAUF, P; BURCHARD, G.D; CAUMES, E; JENSENIUS, M; CASTELLI, F; GKRAKIA-KLOTSAS, E; WELD, L; LOPEZ-VELEZ, R; DE VRIES, P; VON SONNENBURG F; LOUTAN, L; PAROLA, P. Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008. *BMC Infect Dis*, v. 10, p. 330, 2010. ISSN 1471-2334.

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. ISSN 0168-6445

FONG, D.; CHANG, K. P. Tubulin biosynthesis in the developmental cycle of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: changes during differentiation of motile and nonmotile stages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 12, p. 7624-8, Dec 1981. ISSN 0027-8424

- FONG, D. et al. Differential expression of mRNAs for alpha- and beta-tubulin during differentiation of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 18, p. 5782-6, Sep 1984. ISSN 0027-8424
- FRAGA, J; MONTALVO, A. M; VAN DER AUWERA, G; MAES, I; DUJARDIN, J. C; REQUENA, J. M. 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. 238–245, 2010.
- FRANKOWSKI, H. et al. Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures. **Methods Mol Biol**, v. 814, p. 221-33, 2012. ISSN 1940-6029
- FROMMEL, T. O. et al. The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 38, n. 1, p. 25-32, Jan 1 1990. ISSN 0166-6851
- GEYER, P. E. et al. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. **Mol Syst Biol**, v. 13, n. 9, p. 942, Sep 26 2017. ISSN 1744-4292
- GRECO, T. M.; CRISTEA, I. M. Proteomics Tracing the Footsteps of Infectious Disease. **Mol Cell Proteomics**, v. 16, n. 4 suppl 1, p. S5-S14, Apr 2017. ISSN 1535-9484
- GRIMALDI, G., JR.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, n. 3, p. 230-50, Jul 1993. ISSN 0893-8512
- GOTO, H; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2012; 26(2): 293-307.
- 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. ISSN 1615-9853
- HAJJARAN, H. et al. Comparison of the Proteome Profiling of Iranian isolates of *Leishmania tropica*, *L. major* and *L. infantum* by Two-Dimensional Electrophoresis (2-DE) and Mass-spectrometry. **Iran J Parasitol**, v. 10, n. 4, p. 530-40, Oct-Dec 2015. ISSN 1735-7020
- HALLE, M. et al. The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. **J Biol Chem**, v. 284, n. 11, p. 6893-908, Mar 13 2009. ISSN 0021-9258
- HLAVACOVA, J.; VOTYPKA, J.; VOLF, P. The effect of temperature on *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) development in sand flies. *Journal of medical entomology*, v. 50, n. 5, p. 955–8, set. 2013.
- HOMBACH, A; OMMEN, G.; MACDONALD, A.; CLOS, J. A small heat shock protein is essential for thermotolerance and intracellular survival of *Leishmania donovani*. **J Cell Sci**, v. 127, n. Pt 21, p. 4762-73, Nov 1 2014. ISSN 1477-9137

HUNTER, K. W.; COOK, C. L.; HAYUNGA, E. G. Leishmanial differentiation in vitro: induction of heat shock proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 125, n. 2, p. 755–60, 14 dez. 1984.

ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 72, 2012. ISSN 2235-2988

IVENS, A. C. et al. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005.

JOHNSON, J. L. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 3, p. 607-13, Mar 2012. ISSN 0006-3002

KLEMBA, M.; GOLDBERG, D. E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 275-305, 2002. ISSN 0066-4154

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. *Dermatol Clin*, v. 33, n. 3, p. 579-93, Jul 2015. ISSN 1558-0520.

KILLICK-KENDRICK, R; LAINSON, R; RIOUX, J. A; SAF'JANOVA, V. M. The taxonomy of *Leishmania*-like parasites of reptiles. In: Rioux JA. *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse. Application Éco-épidémiologiques* (Colloque International du CNRS/INSERM, 1984), 1986; IMEE, Montpellier.

KOHN, E. C. et al. Proteomics as a tool for biomarker discovery. **Dis Markers**, v. 23, n. 5-6, p. 411-7, 2007. ISSN 0278-0240

KUMAR, A; MISRA, P; SISODIA, B; SHASANY, A. K; SUNDAR, S; DUBE, A. Proteomic analyses of membrane enriched proteins of *Leishmania donovani* Indian clinical isolate by mass spectrometry. *Parasitol Int*, v. 64, n. 4, p. 36-42, Aug 2015. ISSN 1873-0329.

LAHAV, T. et al. Multiple levels of gene regulation mediate differentiation of the intracellular pathogen *Leishmania*. **Faseb j**, v. 25, n. 2, p. 515-25, Feb 2011. ISSN 0892-6638.

LAINSON, RALPH. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 1, n. 2, p. 13-32, jun. 2010.

LAINSON, R.; READY, P. D.; SHAW, J. J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian “uta”, as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, v. 206, n. 1164, p. 307–318, 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *British medical bulletin*, v. 28, n. 1, p. 44–8, jan. 1972.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmanias and leishmaniasis of the New World, with particular reference to Brazil]. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Pan American Sanitary Bureau, v. 76, n. 2, p. 93–114, fev. 1974.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press Inc. 1–120.1987.

LANDFEAR, S. M.; WIRTH, D. F. Control of tubulin gene expression in the parasitic protozoan *Leishmania enriettii*. **Nature**, v. 309, n. 5970, p. 716-7, Jun 21-27 1984. ISSN 0028-0836

LANOTTE, G; RIOUX, J. A; MAAZOUN, R; PASTEUR, N; PRATLONG, F; LEPART, J.. [The application of a numerical method to the taxonomy of the genus *Leishmania* Ross, 1903,- -The recognition of 146 original lines in the Old World. Use of allozymic characters. Epidemiological and phyletic significance (author's transl)]. *Annales de parasitologie humaine et comparee*, v. 56, n. 6, p. 575–91, 1981.

LE BLANCQ, S. M.; BELEHU, A.; PETERS, W. *Leishmania* in the Old World: 3. The distribution of *L. aethiopica* zymodemes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, n. 3, p. 360–6, 1986.

LEIFSO, K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. **Mol Biochem Parasitol**, v. 152, n. 1, p. 35-46, Mar 2007. ISSN 0166-6851

LIMA, B. S; PIRES, S. F; FIALHO, L. C; OLIVEIRA, E. J; MACHADO-DE-AVILA, R. A; CHAVÉZ-OLÓRTEGUI, C; CHAPEAUROUGE, A.D; PERALES, J; ANDRADE, H, M. A proteomic road to acquire an accurate serological diagnosis for human tegumentary leishmaniasis. *J Proteomics*, Jun 1 2016. ISSN 1876-7737.

LIST, E. O. et al. The Use of Proteomics to Study Infectious Diseases. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 8, n. 1, p. 31-45, 2008. ISSN 1871-5265/2212-3989.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023

LYNN, M. A.; MARR, A. K.; MCMASTER, W. R. Differential quantitative proteomic profiling of *Leishmania infantum* and *Leishmania mexicana* density gradient separated membranous fractions. **J Proteomics**, v. 82, p. 179-92, Apr 26 2013. ISSN 1874-3919.

MANN, M. Origins of mass spectrometry-based proteomics. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 17, n. 11, p. 678, Nov 2016. ISSN 1471-0080

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 80, n. 6, p. 859-76, 1986. ISSN 0035-9203 (Print) 0035-9203.

- MARTINY, D; BART, A; VANDERBERG, O; VERHAAR, N; WENTINK-BONNEMA, E; MOENS, C; VAN GOOT, T. Subtype determination of Blastocystis isolates by matrix- assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 33, n. 4, p. 529-36, Apr 2014. ISSN 1435-4373.
- MCCONVILLE, M. J. et al. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **EMBO J**, v. 11, n. 10, p. 3593-600, Oct 1992. ISSN 0261-4189
- MCGWIRE, B. S, SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJ Med*. 2014; 107(1): 7-14.
- MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; ENGMAN, D. M. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. **Infect Immun**, v. 71, n. 2, p. 1008-10, Feb 2003. ISSN 0019-9567
- MEDINA, L. S. et al. The gp63 Gene Cluster Is Highly Polymorphic in Natural *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Populations, but Functional Sites Are Conserved. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0163284, 2016. ISSN 1932-6203.
- MORALES, M. A. et al. Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 18, p. 8381-6, May 4 2010. ISSN 0027-8424.
- MORENO G; RIOUX, J. A; LANOTTE, G; PRATLONG F; SERRES, E. Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numérique. Individualisation du complexe *Leishmania infantum*. In: Rioux JA, editor. *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse. Application Éco-épidémiologiques* (Colloque International du CNRS/INSERM, 1984), 1986; IMEE, Montpellier. pp. 105–117.
- MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 2002.
- MOURI, O; MORIZTO, G; DER AUWERA, G; RAVEL, C; PASSET, M; CHARTREL, N; JOLY, I; THELLIER, M; JAURÉGUIBERRY, S; CAUMES, E; MAZIER, D; MARINACH-PATRICE, C; BUFFET, P. Easy identification of *leishmania* species by mass spectrometry. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 6, p. e2841, Jun 2014. ISSN 1935-2735.
- NESATYY, V. J.; SUTER, M. J. Analysis of environmental stress response on the proteome level. *Mass Spectrom Rev*, v. 27, n. 6, p. 556-74, 2008. ISSN 1098-2787
- NORTH, M. J.; COOMBS, G. H. Proteinases of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes: analysis by gel electrophoresis. **Mol Biochem Parasitol**, v. 3, n. 5, p. 293-300, Sep 1981. ISSN 0166-6851
- OLIVIER, M. et al. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes Infect**, v. 14, n. 15, p. 1377-89, Dec 2012. ISSN 1286-4579.

PACE, D. Leishmaniasis. *J Infect*, v. 69 Suppl 1, p. S10-8, Nov 2014. ISSN 1532-2742.

PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. Proteomics: from protein sequence to function. New York: BIOS Scientific Publishers Limited, 2001.

RAMER-TAIT, A. E. et al. Differential surface deposition of complement proteins on logarithmic and stationary phase *L. (L.) chagasi* promastigotes. *J Parasitol*, v. 98, n. 6, p. 1109-16, Dec 2012. ISSN 0022-3395.

RAMIREZ, C. A.; REQUENA, J. M.; PUERTA, C. J. Alpha tubulin genes from *L. (V.) braziliensis*: genomic organization, gene structure and insights on their expression. *BMC Genomics*, v. 14, p. 454, Jul 6 2013. ISSN 1471-2164.

RANQUE P. Etude morphologique et biologique de quelques Trypanosomides recoltés au senegal. These sciences Marseille, 1973; 378, pp.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*, v. 15, n. 10, p. 19505, Mar 11 2010. ISSN 1560-7917.

REAL, F.; MORTARA, R. A. The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 2, p. e1518, 2012. ISSN 1935-2727.

REAL, F.; POUCHELET, M.; RABINOVITCH, M. *Leishmania (L.) amazonensis*: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages. *Exp Parasitol*, v. 119, n. 1, p. 15-23, May 2008. ISSN 0014-4894

REAL, F.; VIDAL, R. O.; CARAZZOLLE, M. F.; MONDEGO, J. M.; COSTA, G. G.; HERAI, R. H.; WÜRTELE M, DE CARVALHO, L. M.; CARMONA E FERREIRA, R.; MORTARA, R. A.; BARBIÉRI, C. L.; MIECZKOWSKI, P.; DA SILVEIRA, J. F.; BRIONES, M. R.; PEREIRA, G.A.; BAHIA, D. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Research*, v. 20, n. 6, p. 567–581, 2013.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol*, v. 45, n. 1, p. 21-5, Jan 2007. ISSN 0095-1137

REQUENA, J. M.; MONTALVO, A. M.; FRAGA, J. Molecular Chaperones of *Leishmania*: Central Players in Many Stress-Related and -Unrelated Physiological Processes. *Biomed Res Int*, v. 2015, p. 301326, 2015. ISSN 2314-6141

RIOUX, J. A. et al. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, v. 65, n. 3, p. 111–125, 1990.

ROCHLIN, M. W.; DAILEY, M. E.; BRIDGMAN, P. C. Polymerizing microtubules activate site-directed F-actin assembly in nerve growth cones. *Mol Biol Cell*, v. 10, n. 7, p. 2309-27, Jul 1999. ISSN 1059-1524

ROSENZWEIG, D. et al. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *Faseb j*, v. 22, n. 2, p. 590-602, Feb 2008. ISSN 0892-6638.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! **Int Immunol**, v. 30, n. 3, p. 103-111, Mar 10 2018. ISSN 0953-8178.

SAF'JANOVA, V.M. Classification of the genus Leishmania Ross. Chapter 11 (in Russian). In: The Leishmaniasis. Protozoology, Academy of Sciences, USSR All Union Society of Protozoologists, Lennigrad, Part 7, 1982; p. 95–101

SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. C. G. Métodos e estratégias emproteômica e suas aplicações na área vegetal. *Ciência Rural*, v. 40, n. 3, p. 727-734, 2010.

SARAVIA, N. G. et al. Two-dimensional electrophoresis used to differentiate the causal agents of American tegumentary leishmaniasis. **Clin Chem**, v. 30, n. 12 Pt 1, p. 2048-52, Dec 1984. ISSN 0009-9147

SARAVIA, N. G. et al. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *L. (V.) braziliensis* subspecies diversity. **Am J Trop Med Hyg**, v. 34, n. 4, p. 714-20, Jul 1985. ISSN 0002-9637

SARAVIA, N. G. et al. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of Leishmania (Viannia) in Colombia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, n. 1, p. 86-94, Jul 1998. ISSN 0002-9637

SCHÖNIAN, G.; CUPOLILLO, E.; MAURICIO, I. Molecular Evolution and Phylogeny of Leishmania. In: Drug Resistance in Leishmania Parasites. p. 15–44. 2013.

SCHÖNIAN, G.; MAURICIO, I.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of Leishmania? Trends in Parasitology, 2010.

SEDO, O.; VORAC, A.; ZDRAHAL, Z. Optimization of mass spectral features in MALDI-TOF MS profiling of Acinetobacter species. *Syst Appl Microbiol*, v. 34, n. 1, p. 30-4, Feb 2011. ISSN 1618-0984.

SENG, P. ROLAIN, J. M; FOURNIER, P. E; LA SCOLA, B; DRANCOURT, M; RAOULT, D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol*, v. 5, n. 11, p. 1733-54, Nov 2010. ISSN 1746-0921.

SOONG, L. Subversion and Utilization of Host Innate Defense by *L. (L.) amazonensis*. *Frontiers in immunology*, v. 3, p. 58, 2012.

SOONG, L.; CHANG, C. H.; SUN, J.; LONGLEY, B. J.; RUDDLE, N. H.; FLAVELL, R. A.; MCMAHON-PRATT, D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *L. (L.) amazonensis* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 158, n. 11, p. 5374–83, 1 jun. 1997.

SHAW, J. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, 1997. ISSN 0100-8455.

SHERWIN, T.; GULL, K. The cell division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 323, n. 1218, p. 573-88, Jun 12 1989. ISSN 0962-8436

SILVA-ALMEIDA, M. et al. Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 387, Aug 20 2014. ISSN 1756-3305.

SILVA, A. M.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; COOMBS, G. H. Metabolic variation during development in culture of *Leishmania donovani* promastigotes. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 12, p. e1451, Dec 2011. ISSN 1935-2727.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 3, p. 311-30, Mar 2006. ISSN 0971-5916

SMEJKAL, R. M.; WOLFF, R.; OLENICK, J. G. *L. (V.) braziliensis panamensis*: increased infectivity resulting from heat shock. **Exp Parasitol**, v. 65, n. 1, p. 1-9, Feb 1988. ISSN 0014-4894

SUNDAR, S.; SINGH, B. Understanding *Leishmania* parasites through proteomics and implications for the clinic. **Expert Rev Proteomics**, v. 15, n. 5, p. 371-390, May 2018. ISSN 1478-9450.

TEIXEIRA, P. C.; VELASQUEZ, L. G.; LEPIQUE, A. P.; DE REZENDE, E.; BONATTO, J. M. C.; BARCINSKI, M. A.; CUNHA-NETO, E.; STOLF, B. S. Regulation of *Leishmania (L.) amazonensis* Protein Expression by Host T Cell Dependent Responses: Differential Expression of Oligopeptidase B, Tryparedoxin Peroxidase and HSP70 Isoforms in Amastigotes Isolated from BALB/c and BALB/c Nude Mice. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003411, 18 fev. 2015.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, v. 68, n. 2, p. 107-8, 1993.

TSIGANKOV, P; GHERARDINI, P. F; HELMER-CITTERICH, M; SPÄTH§, G; ZILBERSTEIN, D. Phosphoproteomic analysis of differentiating *Leishmania* parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif. **J Proteome Res**, v. 12, n. 7, p. 3405- 12, Jul 5 2013. ISSN 1535-3907.

TOBY, T. K.; FORNELLI, L.; KELLEHER, N. L. Progress in Top-Down Proteomics and the Analysis of Proteoforms. **Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)**, v. 9, n. 1, p. 499-519, Jun 12 2016. ISSN 1936-1335

VALLEDOR, L.; JORRIN, J. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **J Proteomics**, v. 74, n. 1, p. 1-18, 2011. ISSN 1876-7737.

VENKATESH, A. et al. A Perspective on Proteomics of Infectious Diseases. **Proteomics Clin Appl**, v. 12, n. 4, p. e1700139, Jul 2018. ISSN 1862-8354

WALTHER, T. C.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. **The Journal of Cell Biology**, v. 190, p. 491-500, 2010-08-23 00:00:00 2010.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Mol Biochem Parasitol**, v. 132, n. 1, p. 1-16, Nov 2003. ISSN 0166-6851

ZARLEY, J. H.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Hydrogen peroxide-mediated toxicity for *Leishmania donovani* chagasi promastigotes. Role of hydroxyl radical and protection by heat shock. **J Clin Invest**, v. 88, n. 5, p. 1511-21, Nov 1991. ISSN 0021-9738

ZHANG, Y. et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chem Rev**, v. 113, n. 4, p. 2343-94, Apr 10 2013. ISSN 1520-6890

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annu Rev Microbiol**, v. 48, p. 449-70, 1994. ISSN 0066-4227

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em 13.mar.2019