



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Papel do glicolípídeo PGLI na interação do *Mycobacterium leprae* com a célula de Schwann: participação na internalização bacteriana, na modulação de receptores endocíticos e no metabolismo lipídico.

por

Chyntia Carolina Díaz Acosta

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani

Colaborador: Dr. Marcia de Berrêdo-Pinho Moreira

RIO DE JANEIRO

2016

A 185 Acosta, Chyntia Carolina Díaz

Papel do glicolípido PGLI na interação do *Mycobacterium leprae* com a célula de Schwann: participação na internalização bacteriana, na modulação de receptores endocíticos e no metabolismo lipídico. / Chyntia Carolina Díaz

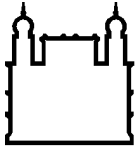
Acosta. – Rio de Janeiro, 2016.

xiv, 254 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016. Bibliografia: f.127-138

1. *Mycobacterium leprae*
2. PGLI
3. Células de Schwann
4. Interação patógeno-hospedeiro

CDD 614.579



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Papel do glicolípido PGLI na interação do *Mycobacterium leprae* com a célula de Schwann: participação na internalização bacteriana, na modulação de receptores endocíticos e no metabolismo lipídico.

AUTOR: Chyntia Carolina Díaz Acosta

ORIENTADOR: Prof. Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Patrícia Cuervo Escobar (IOC-FIOCRUZ) - Presidente

Prof. Dr. Adriane Todeschini (UFRJ)

Prof. Dr. Katherine de Antunes Mattos (Biomanguinhos-FIOCRUZ)

Prof. Dr. Patrícia Torres Bozza (IOC-FIOCRUZ)-Revisor

Prof. Dr. Euzenir Nunes Sarno (IOC-FIOCRUZ)-Suplente

Rio de Janeiro, 31 de março de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani pela oportunidade, a paciência, a dedicação e o cuidado. À Dra. Márcia de Berrêdo Pinho pelo suporte para o andamento da tese, assim como pela paciência e o apoio inclusive da família. Aos pesquisadores do laboratório. Ao Dr. Flávio Lara pela ajuda no uso do microscópio de fluorescência e à Dra. Luciana Rodriguez pela ajuda inicial nos experimentos de citometria de fluxo. À Dra. Patrícia Cuervo, Dra. Letícia Lery e Andrés Rodrigues pela apoio na área de proteômica. Ao João Pedro pela ajuda no laboratório. À Dra. Katherine Mattos pelo aprendizado. Às agências de fomento CAPES, IOC pelo suporte financeiro que possibilitaram o andamento e finalização dessa tese. Agradeço ao “Instituto de Investigaciones en Ciencias de La Salud” (IICS)-“Universidad Nacional de Asunción” (UNA) pelo apoio. À pós-graduação do curso BCM do Instituto Oswaldo Cruz- Fiocruz como plataforma de ensino. Aos colegas do Hospital de Clínicas (Medicina-UNA) e o IICS (UNA) pela experiência de trabalho adquirida antes do doutorado. Aos professores da Faculdade de Ciências Químicas (UNA) pelo aprendizado durante a graduação. Agradeço à minha família, aos colegas e funcionários do Pav. de Hanseníase e à família Lamicel e LABMAM.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIACOES.....	xv
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT	xix
INTRODUÇÃO	1
1.1. Hanseníase - aspectos históricos e tratamento	1
1.2 Epidemiologia.....	2
1.3 Classificação	4
1. 4 A lesão neural na hanseníase	6
1.5 <i>Mycobacterium leprae</i>	9
1.5.1 Considerações gerais e genoma.....	9
1.5.2 Parede Celular: estrutura e importância biológica.....	11
1.5.3 PGLI: estrutura química e seu potencial como biomarcador da hanseníase .	13
1.6 Interação <i>M. leprae</i> -Célula de Schwann	15
1.6.1 Laminina e PGL I - Atores essenciais na internalização do <i>M. leprae</i>	18
1.6.2 Potenciais ligantes envolvidos no reconhecimento e internalização do <i>M. leprae</i> - Destaque para o Receptor de Manose.	21
1.6.3 Desmielinização induzida pelo <i>M. leprae</i> e o envolvimento do PGLI.	22
1.7 Efeito imunomodulador de <i>M. leprae</i> e o papel do PGLI.....	23
1.8 <i>M. leprae</i> e o metabolismo lipídico	24

1.8.1 <i>M. leprae</i> e corpúsculos lipídicos	24
1.8.2 O receptor PPAR γ	25
1.9 <i>M. bovis</i> BCG recombinante expressando PGLI como ferramenta de análise do papel do PGLI na interação <i>M. leprae</i> -CS.....	28
JUSTIFICATIVA	29
OBJETIVOS	30
Objetivo Geral	30
Objetivos Específicos	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Micobactérias	31
4.2 Avaliação de viabilidade micobacteriana.....	33
4.3 Cultivo e manutenção de CS humanas primárias e da linhagem ST8814	34
4.4 Marcação de <i>M. leprae</i> com o fluoróforo PKH26 (vermelho) ou PKH67 (verde).	35
4.5 Protocolo para recobrir partículas de látex ou “beads” de latex com glicolipídeos	35
4.6 Monitoramento do grau de fagocitose	36
4.7 Detecção e quantificação de corpúsculos lipídicos (CLs)	36
4.8 Marcação de superfície e intracelular do Receptor de Manose:	38
4.9 Quantificação de citocinas em sobrenadantes de cultura.	38
4.10 Análise da expressão de proteína por Western Blot.	39
4.11 Extração de RNA de células de Schwann.....	40
4.12 Tratamento com desoxirribonuclease (DNAse).....	40

4.13 Síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA total por transcrição reversa (RT).....	41
4.14 PCR em tempo real.....	41
4.15 Silenciamento com siRNA para <i>mrc1</i>	42
4.16 Análise estatística	43
4.17 Espectrometria de Massa Orbitrap.....	43
4.17.1 Interação entre PGLI e extractos enriquecidos em proteínas de membrana ou de citosol de células de Schwann humanas.....	43
4.17.2 Digestão em solução:.....	44
4.17.3 Aquisição de dados por espectrometria de massas “label free”.....	45
4.17.4 Processamento dos dados de espectrometria de massas.....	46
4.17.5 Análise de bioinformática	48
RESULTADOS.....	49
5.1 PGLI participa da adesão e internalização de <i>M. leprae</i> em células de Schwann humanas da linhagem ST8814.	49
5.2 A associação de BCGPGLI à CS é um fenómeno dependente do tempo e da viabilidade dos bacilos	52
5.3 Mapeamento da porção da molécula do PGLI responsável pela interação com a célula de Schwann.....	55
5.4 Interação de <i>M. leprae</i> , das cepas de BCG recombinante, e dos “beads” de látex com células de Schwann primárias humanas.....	57
5.5 A pré-infecção com BCGPGLI ou <i>M. leprae</i> favorece a internalização de BCGWT em células de Schwann.....	58
5.6 “Cross talk” entre PPAR γ e CD206 em células de Schwann infectadas com <i>M. leprae</i> e BCGPGLI.....	69

5.7 A indução de CD206 promovida pela infecção com <i>M. leprae</i> ou BCGPGLI leva a um aumento de produção de IL-8.	73
5.8 Formação de corpúsculos lipídicos em células de Schwann.	75
5.8.1 BCGPGLI induz a formação de CLs em células de Schwann da linhagem ST8814.....	75
5.9 Identificação de complexos protéicos e interações proteína-ligante entre a molécula PGLI e células de Schwann por espectrometria de massas.....	84
5.9.1 Otimização da aquisição de dados de LC-MS/MS.	86
5.9.2 Identificação de ligantes diretos ou indiretos a PGLI-M e PGLTB-M.....	88
5.9.3 Análise funcional preliminar dos dados proteômicos. Análise das proteínas totais identificadas na amostra PGLI-M.....	92
5.9.4 Análise Comparativa PGLI-M x PGLTB-M Abordagem qualitativa.....	94
5.9.5 Análise Comparativa PGLI-M x PGLTB-M- Abordagem quantitativa.	102
DISCUSSÃO	105
CONCLUSÃO.....	126
BIBLIOGRAFIA	128
ANEXOS	140

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação mostrando em destaque países considerados como referência de maior endemicidade para a hanseníase.....	2
Figura 2. Ciclo de transmissão de <i>M. leprae</i> . Adaptado de Visschedijk et al, 2000. ...	3
Figura 3. Representação esquemática do perfil espectral da hanseníase baseada na classificação de Ridley e Jopling, 1966.....	5
Figura 4. Representação gráfica do percentual de genes codificantes e não codificantes assinalados para funções majoritárias anotadas por Cole S. e colaboradores.....	11
Figura 5. Modelo esquemático dos componentes básicos da parede celular de <i>M. leprae</i>	12
Figura 6. Estrutura do PGLI.....	14
Figura 7. Estrutura química dos diferentes glicolípídeos fenólicos (PGLs) micobacterianos.	14
Figura 8. Representação esquemática da interação <i>M. leprae</i> com a unidade axônio célula de Schwann.	18
Figura 9. Sítios de ligação de integrinas nas cadeias de laminina α , β e γ	19
Figura 10. PGLI promove a adesão e internalização do BCGWT em células de Schwann da linhagem ST8814.	50
Figura 11. PGLI promove a internalização do BCG em células de Schwann da linhagem ST8814.	51
Figura 12. Associação de BCGPGLI às células de Schwann ST8814 é tempo dependente.	52
Figura 13. BCGPGLI vivo é mais internalizado por células de Schwann quando comparado com o morto.	53

Figura 14. <i>M. leprae</i> vivo é mais internalizado por células de Schwann quando comparado com o morto.....	54
Figura 15. Associação de micobacterias vivas e mortas às células de Schwann ST8814.....	55
Figura 16. Preparação de “beads” de látex recobertos com PGLI e ND-o-BSA.....	56
Figura 17. A porção dissacarídica correspondente à extremidade não redutora do trissacarídeo do PGLI mimetiza a capacidade da molécula inteira de interagir com as células de Schwann.	57
Figura 18. PGLI promove a internalização de BCG e beads de látex em células de Schwann primárias humanas.	58
Figura 19. A pré-infecção com BCGPGLI ou <i>M. leprae</i> vivo aumenta a internalização de BCGWT em células de Schwann.	60
Figura 20. O pré-estímulo com “beads”, com “beads” PGLI ou BCGPGLI não aumenta o grau de internalização de BCGWT em células de Schwann.	61
Figura 21. O pré-estímulo com micobacterias expressando PGLI não aumenta a atividade fagocítica da CS de forma inespecífica.	62
Figura 22. O pré-estímulo com <i>M. leprae</i> não favorece a entrada de <i>M. smegmatis</i> em CS..	63
Figura 23. Manose inibe a internalização de BCGWT em CS pré-tratadas com BCGPGLI ou <i>M. leprae</i> vivos..	64
Figura 24. O pré-estímulo com micobacterias vivas expressando PGLI favorece a entrada de “beads” recobertos com Man-LAM em CS.	65
Figura 25. BCGPGLI e <i>M. leprae</i> vivo induzem a expressão de CD206 em células de Schwann.....	66
Figura 26. A infecção por BCGPGLI ou <i>M. leprae</i> vivo aumenta a transcrição de <i>mrc1</i> em células de Schwann.....	67

Figura 27. Verificação do funcionamento do silenciamento do gene que codifica CD206.....	68
Figura 28. O knockdown do receptor de manose afeta o grau de internalização de BCGWT na célula de Schwann.....	69
Figura 29. BCGPGLI e <i>M.leprae</i> vivos induzem a expressão de PPAR γ	70
Figura 30. A inibição de PPAR γ bloqueia a expressão de CD206 induzida por micobacterias vivas em células de Schwann.....	71
Figura 31. A inibição da atividade de PPAR γ diminui a internalização de beads recobertos com LAM em células de Schwann.....	72
Figura 32. O knockdown de CD206 reduz a liberação de IL-8 induzida por <i>M. leprae</i> ou BCGPGLI.....	74
Figura 33. A inibição de PPAR γ bloqueia a liberação de IL-8 induzida por <i>M.leprae</i>	74
Figura 34. BCGPGLI e <i>M.leprae</i> (MOI 50:1) induzem a formação de CLs em células de Schwann da linhagem ST8814.....	76
Figura 35. BCGPGLI vivo e “beads” PGLI internalizados induzem CLs em células de Schwann.....	77
Figura 36. BCGPGLI vivo e “beads” PGLI induzem CLs em células de Schwann humanas primárias.....	78
Figura 37. A internalização de BCGWT na célula de Schwann não resulta na indução significativa de CLs.....	79
Figura 38. A internalização de BCGWT na célula de Schwann após o pré-estímulo com BCGPGLI (5:1) não resulta na indução de CLs.....	80
Figura 39. Microscopia de fluorescência mostrando que o pré-tratamento com GW9662 impede a biogênese de CLs induzido por BCGPGLI vivo, <i>M. leprae</i> vivo ou “beads”PGLI em células de Schwann.....	82

Figura 40. <i>M.leprae</i> e BCGPGLI vivo regulam positivamente a expressão dos genes <i>adrp</i> e <i>cd36</i> em células de Schwann.....	83
Figura 41 Esquema representativo da metodologia utilizada para identificação de proteínas de células de Schwann da linhagem ST8814 potencialmente ligantes de PGLI.	85
Figura 42. Comparação do perfil cromatográfico e espectros de MS obtidos entre os dois métodos de aquisição de dados de LC-MS/MS testados.	87
Figura 43. Diagramas de Venn comparando em número os peptídeos e proteínas identificados por MS/MS provenientes da interação entre “beads”-PGL I e PGL TB com extrato proteico enriquecido em proteínas de membranas das CS.	89
Figura 44. Processos Biológicos associados as proteínas totais identificadas na amostra de PGLI-M.	91
Figura 45. Funções moleculares associadas as proteínas totais identificadas na amostra de PGLI-M.	91
Figura 46. Componentes celulares associados as proteínas totais identificadas na amostra de PGLI-M.	92
Figura 47. Rede de interação de proteínas de PGLI-M, ligantes diretos ou indiretos envolvidos no processo “Transporte mediado por vesícula”.	94
Figura 48. Análise comparativa das proteínas identificadas apenas em PGLI-M e PGLTB-M segundo classificação baseada em processos biológicos envolvidos.....	96
Figura 49. Análise comparativa das proteínas identificadas apenas em PGLI e PGLTB segundo classificação baseada na funções moleculares envolvidas.	97
Figura 50. Análise comparativa das proteínas identificadas apenas em PGLI e PGLTB segundo classificação baseada em componentes celulares..	98
Figura 51. Ligantes diretos ou indiretos identificados em PGLI-M selecionados a partir de redes com p-value de interação significativo.....	101

Figura 52. Rede de interação com os ligantes com fold change positivo na comparação quantitativa PGLI-M versus PGLTB-M.....	104
Figura 53. Ilustração de moléculas ligantes (diretos ou indiretos) de PGLI envolvidos no processo biológico de adesão e endocitose.....	121
Figura 54. Rede de interação de proteínas identificadas na amostra PGLI-M envolvidos na formação de vesículas recobertas por clatrina. Software: Sting v10.122	
Figura 55. Resumo dos resultados obtidos envolvendo o papel do receptor de manose e do fator de transcrição PPAR na internalização de micobactérias em CS-ST8814.....	124
Figura 56. Resumo dos resultados obtidos envolvendo os candidatos receptores ou ligantes de PGLI identificados no extrato enriquecido em proteínas de membrana de CS-ST8814.....	125
Figura 57. Mecanismos moleculares que regulam a internalização de <i>M. leprae</i> e a biogênese e recrutamento de CLs em células de Schwann.....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Moléculas presentes em CS que ligam <i>M. leprae</i>	17
Tabela 2: Sequências dos iniciadores senso e anti-senso de cada gene utilizados na reação de PCR para células ST8814.	42
Tabela 3: Quantificação do grau de adesão e associação das cepas de micobactérias à CS avaliado por microscopia de fluorescência.....	51

LISTA DE ABREVIACOES

ADC	albumina bovina, dextrose, catalase
ADRP	“Adipose differentiation related protein”
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
BAAR	bacilo álcool-ácido resistente
BB	“borderline bordeline”
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BEI RESOURCES	“Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository”
BL	“borderline” lepromatoso
BSA	albumina sérica bovina
BT	“borderline” tuberculóide
cDNA	ácido nucleico complementar
°C	Graus Celsius
CS	células de Schwann
CD	grupo de diferenciação
DC-SIGN	receptor de células dendríticas
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
dsDNA	DNA dupla-fita
D.O.	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
ECM	extra cellular matrix
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	ensaio imunoenzimático
g	força-G
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GFP	proteína verde fluorescente
h	horas
HEC	human umbilical vein

HCl	ácido clorídrico
IFN	interferon
IgM	imunoglobulina M
IL-	interleucina
KCl	cloreto de potássio
LAM	lipoarabinomanana
LDL	lipoproteína de baixa intensidade
LL	lepromatoso lepromatoso
M	Molar
M.	Mycobacterium
Mb	mega pares de base
MB	multibacilar
MeCN	acetonitrila
miRNA	microRNA
mL	mililitro
μ M	micromolar
mM	milimolar
MOI	multiplicidade de infecção
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanesulfônico
RM	receptor de manose
mrc1	gene que codifica a proteína
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
ng	nanograma
nM	nanomolar
nm	nanômetros
OligoDT	oligonucleotídeo iniciador de timidinas
OMS	Organização Mundial da Saúde
DAMP	padrões moleculares associados a danos
PAMP	padrões moleculares associados a patógenos
PB	paucibacilar
PBS	tampão salina fosfato

PCR	reação em cadeia da polimerase
PGLI	glicolípido fenólico I
PGL bovis	glicolípido fenólico de <i>M. bovis</i> BCG
PGL TB	glicolípido fenólico de <i>M. tuberculosis</i>
pH	potencial de hidrogênio
PNL	forma neural pura
PPD	derivado proteico purificado
PQT	poliquimioterapia
PRR	receptor de reconhecimento de padrões
qRT-PCR	RT-PCR quantitativo (em tempo real)
RD	região de diferença
RPL13	proteína ribossomal 60S L13
RNA	ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
ROS	espécies reativas de oxigênio
RPM	rotações por minuto
RPMI	“Royal Park Memorial Institute”
RR	reação reversa
RT	transcrição reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SNP	polimorfismo de base única
ssRNA	RNA simples-fita
TE	tampão Tris EDTA
Th	linfócitos T auxiliares (T helper)
TLR	receptores do tipo Toll
TNF	fator de necrose tumoral
TT	tuberculóide tuberculóide
U	Unidade
VDR	receptor de vitamina D
v/v	volume por volume

RESUMO

A parede celular de micobactérias patogênicas é rica em glicolipídeos complexos, tais como os glicolipídeos fenólicos (PGLs). O PGLI, específico da parede do *Mycobacterium leprae*, apresenta uma porção trissacarídea que não é encontrada em PGLs de outras micobactérias. De acordo com a literatura, o PGLI é responsável pelo neurotropismo de *M. leprae* já que se liga especificamente à laminina da lâmina basal de células de Schwann (CS) através da porção trissacarídica da molécula, permitindo a invasão de CS. Além do seu papel na aderência e invasão, o PGLI encontra-se envolvido na modulação da resposta imune. Estudos anteriores mostraram que *M. leprae* é capaz de perturbar a homeostase lipídica de células infectadas, resultando na formação de corpúsculos lipídicos (CL). Diversas moléculas têm sido correlacionadas com a biogênese destes corpúsculos, todavia o envolvimento do PGLI nesse mecanismo ainda não foi descrito. Utilizando uma cepa recombinante de *Mycobacterium bovis* BCG que expressa PGLI (BCGPGLI) nosso objetivo foi estudar a participação deste glicolipídeo na internalização bacteriana e seu efeito no fenótipo da CS. Observamos que a expressão de PGLI promove a adesão e internalização do BCG e partículas de látex (“beads”) em CS da linhagem ST8814 e CS humanas primárias, e que a extremidade dissacarídica não redutora do glicolipídeo é essencial neste processo. A capacidade de invadir CS também se correlacionou positivamente com viabilidade bacteriana, sendo as bactérias mortas internalizadas com menor eficiência. Observamos que os bacilos vivos, imediatamente após a infecção, modificam o repertório de receptores de fagocitose na CS, proporcionando a entrada de novas bactérias por vias alternativas que, possivelmente, favorecem a infecção e persistência bacteriana. Dentre os receptores modulados, identificamos o CD206, receptor de manose da família de lectinas tipo C. Mostramos que CD206 é induzido na célula infectada através do aumento de expressão e ativação do fator de transcrição nuclear PPAR γ . Estes resultados confirmaram a existência de um “cross talk” entre PPAR γ e CD206 descrito na literatura, mas agora no contexto de CS. Além da capacidade de invasão, avaliamos também a indução de formação de CLs. O BCGPGLI vivo e “Beads” PGLI foram capazes de induzir CLs em CS, enquanto que a cepa BCGWT, mesmo internalizada, não induziu CLs. A indução de CLs foi também dependente de PPAR γ . Paralelamente, através de análise de proteômica, iniciamos a identificação de ligantes candidatos de PGLI a partir de extrato enriquecido em proteínas de membrana de CS. A determinação de ligantes/receptores candidatos podem nos ajudar a entender melhor o processo de internalização do *M. leprae* via PGLI, assim como os processos metabólicos ou vias de sinalização modulados por esta molécula. Em resumo, nossos dados fortalecem o papel do PGLI como molécula chave na patogenia do *M. leprae* no nervo periférico, e sinalizam que a viabilidade do bacilo tem um impacto fundamental neste processo.

ABSTRACT

The cell wall of pathogenic mycobacteria is rich in complex glycolipids, such as phenolic glycolipids (PGLs). PGLI is specific of *Mycobacterium leprae* and its structure contains a trisaccharide moiety that can not be found in other mycobacteria. According to previous reports, PGLI is responsible for *M. leprae* neurotropism, since it binds to laminin present in the Schwann cell (SC) basal lamina, through its carbohydrate moiety, allowing *M. leprae* invasion of SC. Besides its role in adhesion and cell invasion, PGLI is involved in the modulation of the immune response. Previous reports have also shown that *M. leprae* perturbs host cell lipid homeostasis resulting in lipid droplets formation (LD). Several molecules have been associated with the biogenesis of these LDs, but the involvement of PGLI in this process has not been established yet. Using a recombinant strain of *Mycobacterium bovis* BCG that expresses PGLI (BCGPGLI) our goal was to study the role of this glycolipid in bacterial internalization and its effects on SC phenotype. We observed that PGLI promotes adhesion and internalization of BCGWT and látex beads in ST8814-SC and primary human SC, and that the nonreducing end disaccharide of PGLI is essential for this process. The capacity to invade SC was also positively correlated with bacterial viability, as we observed that dead bacilli were less internalized. Furthermore, we observed that live bacilli immediately after infection modify the repertoire of phagocytic receptors in SC promoting the entrance of new bacteria using alternative pathways, likely favouring infection and bacterial persistence. Among the receptors modulated, we identified CD206, a mannose receptor pertaining to the family of C-type lectins. We showed that CD206 is induced in infected cells by an increase in the expression and activation of the nuclear transcriptional factor PPAR γ . These results confirmed the existence of a cross talk between PPAR γ and CD206 previously described but now in the context of SC. Besides the capacity of invasion, we also investigated the induction of LDs. Live BCGPGLI and PGLI-coated beads were capable of inducing LDs in SC, while BCGWT even internalized didn't induce LD formation. The induction of LDs was also dependent on PPAR γ . In parallel, a proteomic analysis was conducted to identify ligand candidates of PGLI using an extract enriched in membrane proteins of SC. The identification of these candidate/receptor ligands could help us to better understand the process of *M. leprae* internalization via PGLI as well as metabolic and signaling pathways involved. Overall, our data reinforce the role of PGLI as a key molecule in *M. leprae* pathogenesis in the nerve, and point to the viability status of *M. leprae* as an important feature in this process.

INTRODUÇÃO

1.1. Hanseníase - aspectos históricos e tratamento

A Hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular, também conhecido como bacilo-de-Hansen. Esta doença data de tempos bíblicos, com referências textuais de 600 anos a.C. (OMS, 2014). O termo hanseníase é um tributo ao médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, que identificou o bacilo *M. leprae* como agente etiológico desta doença no ano de 1873 (1). Estudos recentes de genômica comparativa com cepas de *M. leprae* sugerem que a doença originou-se no leste africano, ou próximo ao oriente, e se dispersou acompanhando as migrações humanas (2). O surgimento da hanseníase no ocidente africano e nas Américas ocorreu ao longo dos últimos 500 anos, devido à entrada de europeus e norte-africanos (3). Na América Latina acredita-se que o aparecimento da hanseníase se deu durante o período de colonização e o tráfico de escravos foi a principal causa de sua disseminação. No Brasil, os primeiros casos foram reportados no ano de 1600 na cidade do Rio de Janeiro (4). Durante muitos anos o isolamento social compulsório representou a principal estratégia de “tratamento” dos pacientes com “lepra”. A partir da década de 40, com a introdução da dapsona, extinguiu-se a reclusão dos pacientes em “leprosários”, no entanto, este isolamento só foi abolido oficialmente no ano 1962, e só acabou de fato em 1986. Devido a casos de resistência ao tratamento com dapsona, a Organização Mundial da Saúde no ano 1970, recomendou o uso de multidrogaterapia. Portanto, desde 1980, a hanseníase vem sendo tratada desta maneira em regime ambulatorial. A poliquimioterapia (PQT) foi oficialmente implementada e extensivamente utilizada no Brasil a partir de 1993 (4). A PQT consiste na administração de três drogas, rifampicina, dapsona e clofazimina. A duração do tratamento e o esquema terapêutico dependem da forma clínica da doença: dapsona associada à rifampicina por 6 meses para as formas paucibacilares (PB) e dapsona, clofazimina e rifampicina por 12 meses para as formas denominadas multibacilares (MB). Atualmente a única vacina utilizada contra a hanseníase e aprovada para uso humano é *Mycobacterium bovis* BCG. A vacina BCG é utilizada contra *M. tuberculosis*, agente causador da tuberculose, porém, desde 1939, tem sido mostrado que a imunização com o BCG tem um papel protetor contra a hanseníase (4). Entretanto, a eficácia desta vacina é bastante variável. No

Brasil, recomenda-se a revacinação com BCG de contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase que não apresentem sinais e sintomas da doença (5).

1.2 Epidemiologia

A hanseníase ainda é até os dias atuais um sério problema de saúde pública. Dados epidemiológicos mostram que 96% dos novos casos de hanseníase no mundo estão concentrados em 14 países, localizados na faixa intertropical (Figura 1) (OMS, 2014). O Brasil é o país com a maior taxa de incidência da hanseníase na América do Sul e mundialmente ocupa uma posição de destaque, encontrando-se em segundo lugar em número absoluto de casos, perdendo apenas para a Índia (OMS, 2014). Embora o tratamento com PQT tenha reduzido de forma significativa o número de casos desta doença em todo o mundo (OMS, 2014), a incidência de novos casos continua a ocorrer em todas as regiões endêmicas. Dados recentes da OMS revelaram que em 2013, 31.044 novos casos foram detectados apenas no Brasil.

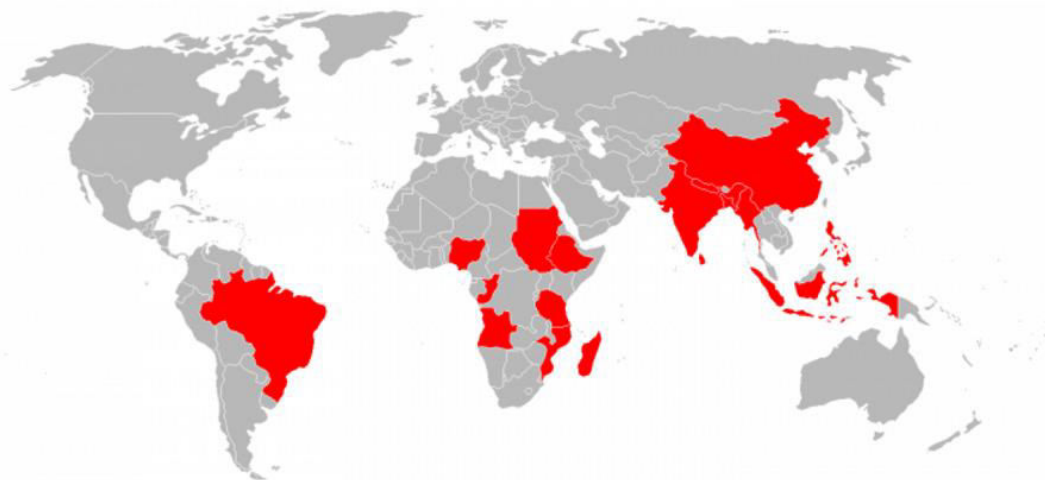


Figura 1. Representação mostrando em destaque países considerados como referência de maior endemidade para a hanseníase.

Entre os países destacados em vermelho, a Índia ocupa o 1º lugar (125.785 novos casos) e o Brasil o 2º lugar (31064 novos casos) em números de casos detectados reportados (OMS, 2014).

Estes dados mostram que o Brasil ainda não conseguiu atingir a meta de eliminação da hanseníase, que segundo a OMS, deve ser inferior a 1 caso/10.000 habitantes. Este quadro é reflexo de vários fatores, dentre eles, o difícil diagnóstico e o longo período de incubação do bacilo (2 a 20 anos), que propicia ainda mais sua transmissão. Portanto, constata-se que as estratégias atuais de controle da

hanseníase não são suficientes e novas ferramentas são necessárias para sua erradicação.

A dinâmica exata da transmissão da hanseníase ainda é pouco entendida. Embora o *M. leprae* seja um patógeno intracelular obrigatório, alguns estudos buscaram e buscam até os dias atuais identificar a presença do patógeno em reservatórios “não-humanos” (6). Atualmente, o homem ainda é considerado como principal reservatório natural do bacilo, no entanto, alguns estudos sugerem que o *M. leprae* pode estar presente no solo, na água, nas plantas, no interior de outros microorganismos, em insetos, peixes ou em vários animais selvagens naturalmente infectados como amebas, tatus e macacos (6). A transmissão do *M. leprae* ocorre pelo contato direto com pessoas infectadas, sendo o trato respiratório superior a principal porta de entrada e saída do bacilo. Acredita-se, que a inoculação ocorra preferencialmente pela mucosa nasal (7). Os pacientes MB são considerados a principal fonte de infecção, todavia os PB também parecem ter importância na cadeia de transmissão do bacilo (8). Um aspecto interessante é a presença do bacilo em indivíduos saudáveis residentes em áreas endêmicas, detectada através da presença do DNA micobacteriano utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Entretanto, o papel desses indivíduos na transmissão e o seu risco de adoecimento não estão definidos (8,9) (Figura 2).

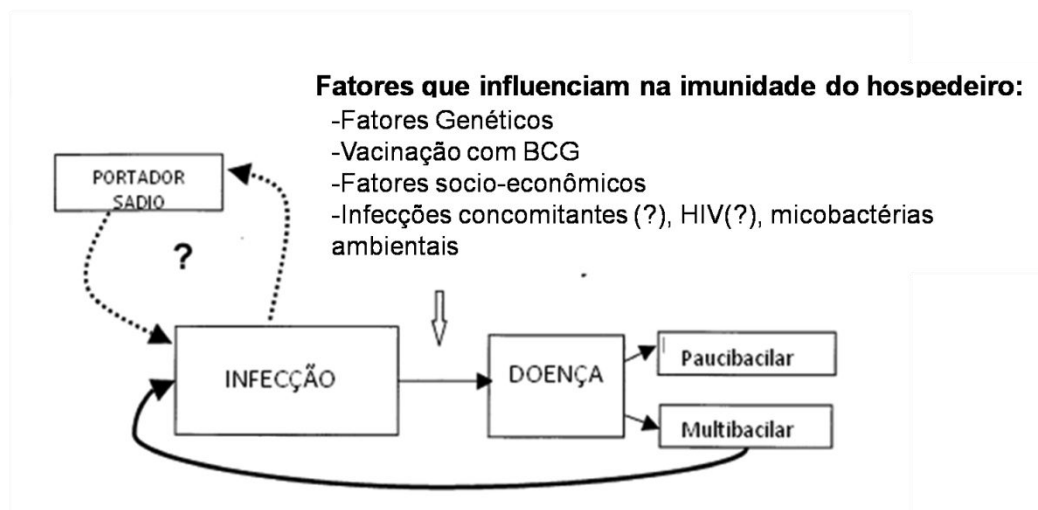


Figura 2. Ciclo de transmissão de *M. leprae*. Adaptado de Visschedijk et al, 2000.

Estudar a dinâmica de transmissão de *M. leprae* torna-se complicada pelo fato deste bacilo não ser passível de cultivo *in vitro* e pela falta de modelos animais.

Na Índia, o tatu (*Dasypus novemcinctus*) foi descartado como fonte de infecção já que estes animais não são encontrados na natureza. Entretanto, a detecção de novos casos em determinadas áreas, onde não se conseguiu estabelecer claramente uma exposição prolongada a pacientes com hanseníase (8), sugere fortemente que outros reservatórios, provavelmente ambientais, poderiam ser responsáveis pela transmissão contínua da hanseníase. No entanto, estudos mais extensivos são necessários para comprovar esta hipótese.

1.3 Classificação

A Hanseníase se manifesta através de um espectro de manifestações clínicas cuja classificação se baseia em critérios clínicos, bacteriológicos, histopatológicos e imunológicos. Uma das ferramentas utilizadas para esta classificação é o teste de Mitsuda, ou imunorreatividade à lepromina, que mede a reação cutânea tardia frente à inoculação de uma suspensão de bacilos mortos pelo calor por via intradérmica. Este teste tem grande valor para a classificação e prognóstico da doença, tendo, no entanto, pouco valor diagnóstico. Basombrio e colaboradores em 1953 (10) propuseram a primeira classificação, denominada classificação de Madri, para os pacientes com Hanseníase que se baseou nesta metodologia e em dados baciloscópicos.

Em função da variabilidade de resposta do indivíduo infectado, as manifestações clínicas vão desde uma forma mais leve da doença com apenas uma ou poucas manchas pálidas na pele, baixa carga bacilar (paucibacilar-PB) conhecida como hanseníase tuberculóide ou pólo tuberculóide (TT). Nestes pacientes, podem-se observar alterações nos nervos próximos à lesão que podem causar dor, fraqueza e atrofia muscular. No outro extremo do espectro encontram-se os pacientes com hanseníase lepromatosa (LL) ou Hanseníase Virchowiana. Esta é a forma considerada mais grave da doença, multibacilar, e altamente infectante. Ocorre nestes indivíduos erupções cutâneas, dormência fraqueza muscular e lesões disseminadas. No teste de Mitsuda, uma resposta negativa é associada ao pólo lepromatoso da doença, ou seja, à incapacidade de responder ao *M. leprae* e, conseqüentemente, eliminá-lo devido a uma pobre resposta celular. Por outro lado, uma resposta positiva está associada à capacidade de desenvolver uma resposta granulomatosa, envolvendo células apresentadoras de antígeno, a participação de

linfócitos CD4⁺ e a capacidade de conter a infecção (11,12). Os indivíduos com hanseníase tuberculóide são Mitsuda positivos.

Ridley & Jopling em 1966 (13) propuseram outra classificação muito utilizada atualmente. Esta classificação permitiu um avanço no entendimento da patologia da hanseníase. Sem alterar fundamentalmente a classificação de Madri e mantendo o conceito de polaridade, permitiu uma melhor compreensão do aspecto espectral da hanseníase, principalmente dos grupos intermediários (“borderlines”) ou dimorfos. Esta classificação também obedece a critérios clínicos e bacteriológicos, mas enfatiza os aspectos imunológicos e histológicos. Neste caso, foi adotado subgrupos dentro do espectro. As formas polares permaneceram como tuberculóide, onde estão os indivíduos PB com elevada resposta imune celular, e lepromatosa, indivíduos MB com uma acentuada resposta humoral. No entanto, as formas intermediárias, também chamadas de dimorfas, foram subdivididas em “borderline-tuberculóide” (BT), “borderline-borderline” (BB) e “borderline-lepromatosa” (BL) (Figura 3). Outra classificação proposta pela OMS em 1982 com objetivo de simplificação divide os pacientes em PB ou MB.

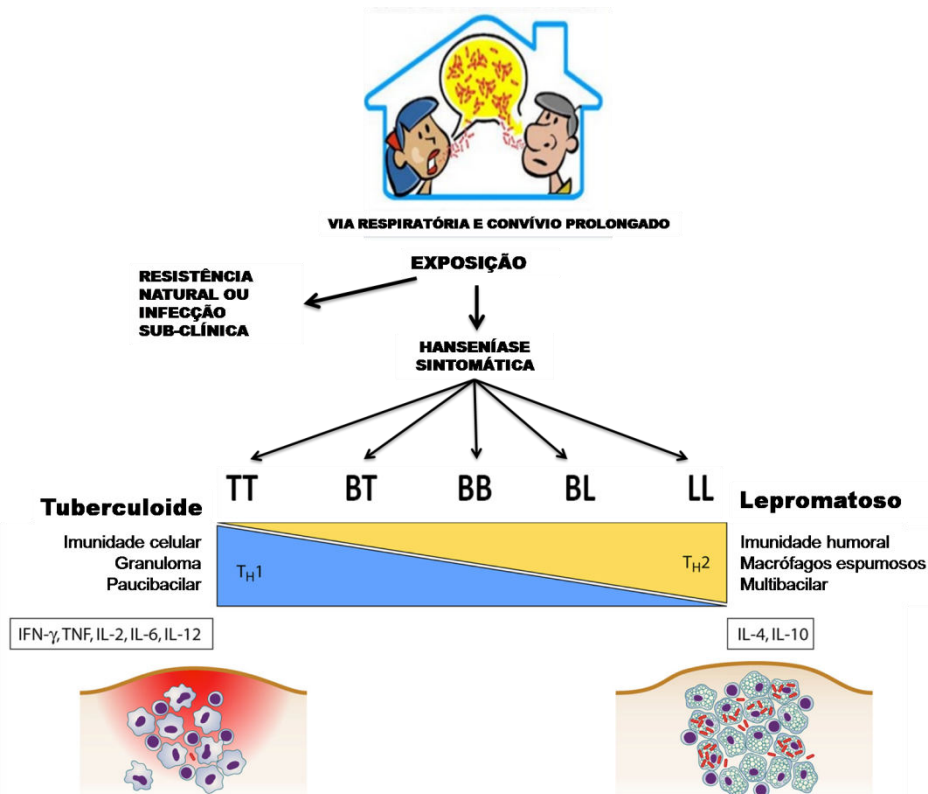


Figura 3. Representação esquemática do perfil espectral da hanseníase baseada na classificação de Ridley e Jopling, 1966.

TT (tuberculóide), BT (“borderline” tuberculóide), BB (“borderline borderline”), BL (“borderline” lepromatosa), LL (lepromatosa). Adaptado de Misch, 2010.

Análise histológica de biópsias de lesões de pele e nervo de pacientes TT e LL, passando pelas formas intermediárias, revela a presença de infiltrados celulares com diferentes características. Em biópsias de lesões de pacientes TT os granulomas são bem organizados com poucos bacilos e macrófagos diferenciados em células epitelióides gigantes multinucleadas. Por outro lado, as lesões de pacientes LL são difusas, pobremente organizadas, apresentando ausência de infiltrados linfóides e presença de macrófagos espumosos, denominados células de Virchow (14). A origem espumosa destas células se correlaciona com a alta carga bacilar e grandes quantidades de lipídeos. Embora por muito tempo tenha sido atribuída a estes lipídeos uma origem bacteriana (15), trabalhos do nosso e outros grupos de pesquisa tem investigado a natureza destes lipídeos e seu papel na patogênese da doença (16–19).

Além das formas clínicas apresentadas existe, ainda, a neuropatia periférica isolada, designada como forma neural pura (PNL), caracterizada por disfunção motora, sensoriais ou ambas. Para o diagnóstico deste tipo de manifestação clínica se faz necessário a utilização de biópsias de nervo periférico, uma vez que esta forma da doença não apresenta lesões cutâneas.

1.4 A lesão neural na hanseníase

Os principais sinais cardinais da hanseníase são lesões cutâneas, espessamento dos nervos e perda de sensibilidade. O dano do nervo sem dúvida é a complicação mais temida, já que leva às deficiências estigmatizantes da doença. Infelizmente sua etiologia e patogenia ainda são pouco compreendidas. Além disto, seu manejo clínico é difícil e sua prevenção ainda limitada.

A neuropatia é um processo lento, progressivo, insidioso e silencioso que pode ocorrer em todas as formas clínicas da hanseníase, até em lesões mais precoces. A inflamação do perineuro e endoneuro que caracterizam esta lesão são consequências da infecção do nervo e se considera característica (20).

Em geral, a neurite aguda acompanha as reações hansênicas, que são episódios de exacerbação inflamatória resultantes de intensa resposta imune do indivíduo ao *M. leprae* de forma repentina e espontânea (21). As duas reações mais importantes observadas na hanseníase são: (i) reação reversa (RR), também

chamada reação tipo 1, que acontece particularmente em pacientes com hanseníase tipo borderline, especialmente durante o tratamento e acomete 8-30% dos pacientes com hanseníase e, (ii) eritema nodoso (ENL) ou reação tipo 2, que acontece principalmente em pacientes do pólo lepromatoso (22). Atualmente, ainda não se conhece precisamente o que leva a um episódio reacional agudo na hanseníase, mas a observação de que eles acontecem com maior frequência durante os primeiros meses após o início do tratamento com PQT, sugere que as frações derivadas após a morte do bacilo podem estar envolvidas (23).

Atualmente o modelo experimental disponível e mais apropriado para o estudo do dano neuronal causado por *M. leprae* é a infecção do tatu de nove bandas, *Dasyus novemcinctus*. Observou-se nestes trabalhos que após a inoculação intravenosa de *M. leprae*, ocorre a infecção natural dos nervos (21). Foi observado que os bacilos se acumulam no sistema linfático epineural atingindo vasos sanguíneos que irrigam o epineuro. O processo inflamatório local observado nas lesões cutâneas acaba por atingir os nervos subcutâneos e posteriormente os troncos nervosos (21). O sistema vascular oferece então, uma rota de entrada para *M. leprae* através da capa perineural para o compartimento endoneural, provavelmente via macrófagos circulantes (21). Acredita-se que a entrada do bacilo nestes compartimentos seja mediada por adesinas e, outros mecanismos não imunológicos que envolvam células endoteliais. Uma vez dentro do fascículo, *M. leprae* é internalizado por CS (mielinizantes ou não) e dentro destas sobrevivem exibindo um perfil de viabilidade similar ao observado dentro de macrófagos (21). Em infecções *in vitro*, a morfologia geral das CS não é alterada, além disto, sua capacidade básica de interagir com axônios ou produzir mielina não é danificada. Esta característica deve-se provavelmente ao *M. leprae* ser um organismo bem adaptado, minimamente tóxico, capaz de habitar vários tipos celulares sem causar uma lesão marcante ou disfuncional (21). No entanto, na hanseníase, neurônios individuais acabam sofrendo desmielinização (21). Isto pode ser induzido por uma série de estímulos. A literatura relata, que níveis altos de algumas citocinas pró-inflamatórias podem contribuir para este fenótipo. E o óxido nítrico, NO, a molécula efetora mais tóxica e letal para *M. leprae*, já foi descrita em infiltrados inflamatórios de nervos em lesões hansênicas (21). Além desta, a nitrotirosina, um metabólito de NO, foi detectada em nervos de lesões de pacientes BL. Em outras doenças esta

molécula foi associada com a peroxidação de lipídeos da bainha de mielina levando à desmielinização de nervos (21). Por outro lado, usando cocultura de CS/neurônio de rato, Rambukkana e colaboradores mostraram que a adesão de *M. leprae* às CS é suficiente para levar a uma rápida desmielinização em ausência de células do sistema imune (24). Dados da literatura ainda descreveram que *M. leprae* é capaz de ligar e ativar o receptor de tirosina quinase ErbB2, que induz a via de transdução de sinal envolvendo Erk1/2 levando à desmielinização e desdiferenciação de CS primárias humanas (25). Apesar disto, pacientes com hanseníase lepromatosa (sem tratamento) apresentam enorme quantidade de bacilos no corpo, mas não apresentam uma desmielinização disseminada.

Macrófagos, dentro dos infiltrados inflamatórios da pele, são as células hospedeiras mais importantes para *M. leprae*. A inflamação crônica e persistente nas lesões de pele pode levar à destruição de glândulas sebáceas, com consequente ressecamento da pele e dos folículos pilosos, por exemplo. Acredita-se que os nervos da pele poderiam ser lesionados pelo mesmo processo inflamatório (20). Na hanseníase tuberculóide, o granuloma pode agir de forma agressiva e destruir estruturas vizinhas. Estudos mostraram que granulomas também podem estar presentes dentro dos nervos e os troncos nervosos. A capacidade destrutiva do processo inflamatório do granuloma é considerada uma explicação básica para a lesão do nervo em pacientes TT e BT (20). Já o mecanismo que leva à lesão de nervos no pólo lepromatoso é mais difícil de explicar já que os nervos mantêm sua integridade básica, assim como mantêm a funcionalidade por um longo tempo apesar de serem altamente infectados (20). A resposta imunológica celular neste caso não é eficiente, mas a inflamação crônica no final leva à destruição do tecido incluindo os nervos (20).

Lesões de pele na hanseníase também apresentam edema, o que poderia ser um potencial mecanismo de dano dos nervos periféricos. No entanto, um edema não explicaria a lesão silenciosa, crônica e indolora do nervo que é comum em pacientes com hanseníase inclusive nos que não fazem reação (20).

Nos pacientes reacionais, observa-se um envolvimento neuronal clinicamente detectável em 10% dos pacientes paucibacilares e 40% dos multibacilares, particularmente em pacientes com reações reversas (22). Acredita-se, no entanto, que o envolvimento neuronal subclínico aconteça em todos os casos, mas, para que

este dano sensorial seja detectado precisa que 30% das fibras nervosas sejam destruídas (22). Considerando que o quadro de RR é acompanhado por uma resposta imune mediada por células, suspeita-se que o sistema imune pode participar do dano neural causado (22). Células T-CD4⁺ são abundantes em lesões de pele de pacientes com RR comparado com lesões de pacientes hansênicos sem episódio reacional. As células T do granuloma são predominantemente CD4⁺, enquanto células T-CD8⁺ se encontram principalmente entorno ao granuloma (22). Na RR também se detecta um aumento de citocinas tipo-1 e em biópsias de pele destes indivíduos detecta-se predominantemente células Th1, que podem contribuir para proteção contra a hanseníase, mas também para imunopatologia da neurite no qual as CS constituem seu alvo principal (22).

Resumindo, a literatura atual indica que o dano do nervo na hanseníase é um processo que envolve múltiplos passos: durante a fase precoce da infecção, *M. leprae* induz desmielinização contato-dependente, o qual pode progredir lentamente e assintomaticamente (neuropatia silenciosa) (23). Por outro lado, uma resposta celular exacerbada ou episódios inflamatórios agudos podem levar ao dano do nervo.

Cada mecanismo de patogenia tem conseqüências em termos de tratamento. Em todos os casos, se o processo não for interrompido por tratamento ou cura espontânea, os resultados finais da infecção dos nervos com *M. leprae* é a desmielinização, a degeneração da fibra nervosa e a fibrose do mesmo.

Entender o processo que leva ao dano do nervo implica conseguir possíveis pontos de intervenção terapêutica. Se vários passos são necessários para a entrada de *M. leprae* em CS, então existem vários pontos potenciais de intervenção. Através do estudo do PGLI e sua relação com a CS, o nosso grupo visa aportar dados para o melhor entendimento da neuropatia hansênica.

1.5 *Mycobacterium leprae*

1.5.1 Considerações gerais e genoma

M. leprae é um microorganismo procarioto, aeróbio, destituído de cílios, imóvel, não esporulado, nem encapsulado pertencente ao grupo dos actinomicetos. Estes bacilos apresentam morfologia bastante variada, com 0,2 - 0,5 µm de largura e

1 - 8 μm de comprimento. Seu aspecto mais freqüente no material colhido em lesões ativas é de bastonetes que podem estar isolados ou agrupados. Assim como outras micobactérias, é considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), devido ao elevado conteúdo de ácidos micólicos, lipídeos estruturais presentes na parede celular da bactéria que tornam esta estrutura altamente hidrofóbica. Portanto, para coloração deste bacilo é utilizado um método mais agressivo chamado Ziehl-Neelsen. O *M. leprae* se multiplica muito lentamente, seu tempo de geração é de aproximadamente duas semanas. A temperatura ótima de crescimento do *M. leprae* é inferior a 37°C, o que pode explicar a sua predileção por áreas superficiais do corpo (26). *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que tem elevado tropismo por CS do sistema nervoso periférico (SNP). Esta afinidade por células da glia do SNP leva a lesões periféricas que resultam desde a perda de sensibilidade até lesões altamente incapacitantes (27). Além desta preferência por CS o *M. leprae* infecta macrófagos e outros tipos celulares como células endoteliais e de epitélio respiratório (28).

Até os dias atuais este bacilo não é passível de ser cultivado *in vitro*. Shepard, em 1960, estabeleceu um protocolo de cultivo *in vivo* deste bacilo no coxim plantar de camundongos BALB/c que possui uma temperatura média de 32°C. Outro modelo animal utilizado para o cultivo de *M. leprae* é o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) (29). Atualmente o modelo de infecção experimental que permite obter uma grande quantidade de bacilos viáveis é realizado em camundongos atímicos (*nude*) devido ao seu alto grau de imunodeficiência e segue a metodologia de Shepard descrita em 1960 (26,30,31).

O fundador do gênero *Mycobacterium* foi possivelmente um organismo de vida livre e as micobactérias de vida livre atuais representam os ramos conservados da micobactéria fundadora (32). *M. leprae*, no entanto, sofreu um processo de evolução reductiva massiva tornando assim *M. leprae* extremamente dependente de um nicho de replicação especializado (33). Estudos de genômica comparativa mostram que, enquanto o *M. tuberculosis* tem um genoma de 4,4Mb com 61-71% de conteúdo G+C, o *M. leprae* apresenta um genoma de 3,3 Mb com um conteúdo G+C de 58%. Este decaimento se reflete no número de genes codificantes. Enquanto o *M. tuberculosis* codifica aproximadamente 3993 genes, o *M. leprae* possui apenas 1614 genes e contém uns 1133 pseudogenes contra somente 6

pseudogenes em *M. tuberculosis* (34). Como consequência desta redução genômica, menos genes são encontrados em quase todas as categorias funcionais (Figura 4).

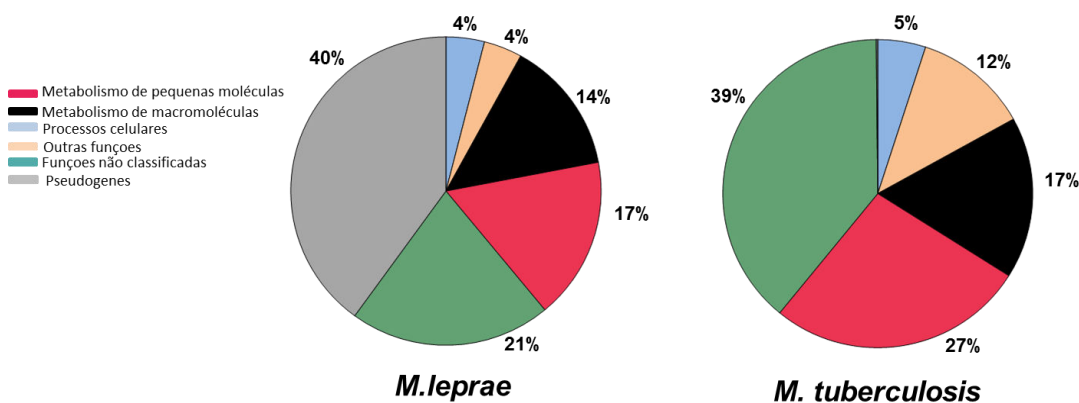


Figura 4. Representação gráfica do percentual de genes codificantes e não codificantes assinalados para funções majoritárias anotadas por Cole S. e colaboradores.
Modificado de Vissa and Brennan *Genome Biology* 2001.

Mutações também foram detectadas em genes envolvidos em regulação, detoxificação, reparo de DNA, transporte e efluxo de metabólitos dentre outros. Os pseudogenes foram encontrados mais frequentemente em vias degradativas do que em vias sintéticas. Logo, por um lado, *M. leprae*, preservou genes envolvidos na transmissão, estabelecimento e sobrevivência no hospedeiro, por outro lado, *M. leprae* perdeu genes que podem ser compensados fazendo uso de maquinaria presente no hospedeiro, como por exemplo, genes envolvidos na regulação do metabolismo e modificação de ácidos graxos, biossíntese da parede celular, o que mostra a importância destas vias metabólicas para este bacilo (33,35).

1.5.2 Parede Celular: estrutura e importância biológica

A definição estrutural da parede celular de micobactérias foi iniciada nos anos de 1960-1970 (36). Atualmente, devido ao uso de técnicas analíticas combinadas ao conhecimento gerado pelas informações genômicas, conseguiu-se compreender não só a estrutura da parede celular micobacteriana, mas sua composição, bases

genéticas e de biossíntese. Uma peculiaridade da parede celular de micobactérias é a grande quantidade de lipídeos, o que confere características únicas ao gênero como resistência a ácidos, extrema hidrofobicidade, impermeabilidade a diversos compostos, característica esta associada à resistência a inúmeras drogas. Esta estrutura é formada por uma camada interna e externa que envolve a membrana plasmática (Figura 5). O compartimento interno é formado por peptidoglicanos (PG) covalentemente ligados às moléculas de arabinogalactanas (AG). Os ácidos micólicos (AM) estão ligados à arabinose presente nas porções terminais destas moléculas de AG formando um complexo AM-AG-PG que se estende por toda parede celular e representa a porção central desta estrutura micobacteriana. A camada mais externa é composta por lipopolissacarídeos como liporabinomanana (LAM), lipomanana (LM), fosfatidilinositol monosídeo (PIM), os lipídeos dimicocerosatos de fitiocerol (DIM e PDIM) e por glicolipídeos como glicolipídeo fenólico I (PGL I) (Figura 5).

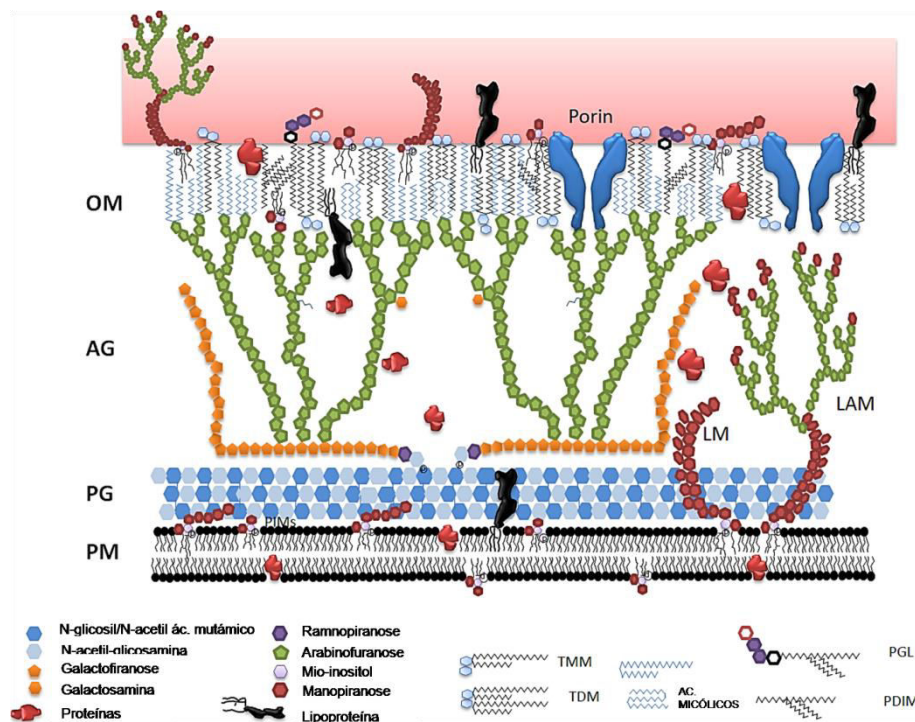


Figura 5. Modelo esquemático dos componentes básicos da parede celular de *M. leprae*.

Parede celular envolvendo a membrana plasmática do *M. leprae*. A parede celular é composta pelo peptidoglicano (PG) ligado covalentemente a arabinogalactanas (AG). Lipoglicanos tais como fosfatidilinositol manosídeos, lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM), se encontram ancoradas a membrana plasmática (PM). Ácidos micólicos estão ligados às porções terminais de arabinose das arabinogalactanas. Na porção mais externa do envelope celular se encontram os glicolipídeos (G) como o monomicolato de trealose (TMM), o glicolipídeo fenólico I (PGLI), fosfatidilinositol manosídeos (PIMs), dimicocerosato de fitiocerol (PDIM) e fosfolipídeos (PL). Proteínas (E) se encontram ancoradas na membrana plasmática e distribuídas na parede celular. AG, arabinogalactana; PG, peptidoglicano; OM, membrana externa. Adaptado de Bhamidi (2008) e Niederweis (2003).

A importância biológica da parede celular reside em diversos aspectos associados à patogênese e imunogenicidade bacteriana. Os componentes desta estrutura micobacteriana são os primeiros a entrar em contato com as células hospedeiras, que usam uma estratégia de reconhecimento baseada na detecção de produtos moleculares de origem microbiana referidos como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (37). Estes PAMPs são frequentemente essenciais para a sobrevivência do patógeno. Diversas moléculas da parede celular têm sido identificadas como PAMPs dentre elas o LAM (38). Outra molécula de enorme importância são os glicolípideos fenólicos (PGLs). Estas moléculas são produzidas por certas micobactérias, a maioria das quais patogênicas (39). No caso do *M. leprae*, o PGL de extrema importância biológica é o PGLI, um glicolípideo exclusivo deste bacilo descoberto em 1980 (40), que vem sendo estudado extensivamente desde então, e que desempenha papel relevante na patogênese da hanseníase (36,41–43).

1.5.3 PGLI: estrutura química e seu potencial como biomarcador da hanseníase

O PGLI encontra-se abundantemente distribuído na superfície celular e representa 3% do peso total do *M. leprae*. Sua estrutura foi elucidada em meados da década de 80 como um trissacarídeo ligado a um substituinte fenólico com uma porção lipídica (41) (Figura 6). O que diferencia e torna o PGLI específico para o *M. leprae* é o fato de esta molécula ter em sua estrutura química um trissacarídeo (3,6,-di-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1->4)-O-(2,3-di-O-metil- α -L-ramnopiranosil)-(1->2)-3-O-metil- α -L-ramnopiranosil) que não é encontrado em PGLs de outras micobactérias (Figura 7). O PGL de *M. tuberculosis* também apresenta um trissacarídeo, mas com composição diferente. Hunter & Brennan (41) descreveram a porção lipídica da molécula. O álcool alifático ftiocerol apresenta-se como uma mistura de dois homólogos: 3-metoxil-4-metil-9,11-dihidroxi octacosano ou 3-metoxil-4-metil-9,11-dihidroxitriacontano. As duas hidroxilas do ftiocerol se encontram, por sua vez, aciladas por uma mistura de micocerosatos C30, C32 ou C34 (2,4,6,8-tetrametilhexacosanoato, 2,4,6,8-tetrametiloctacosanoato e 2,4,6,8-tetrametiltriacontanoate, respectivamente) (Figura 6). Uma grande quantidade de dimicocerosatos de ftiocerol não glicosilados, também denominados de DIM

("dimycocerosyl phthiocerol") ou PDIM ("phthioceryl dimycocerosate") é encontrada na superfície bacteriana juntamente com o PGLI.

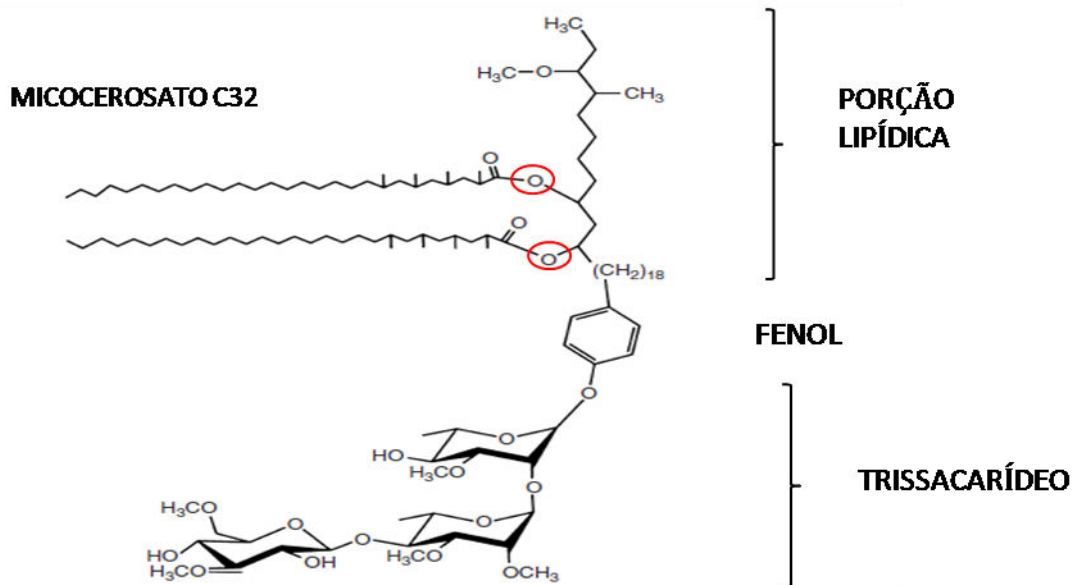


Figura 6. Estrutura do PGLI.

Mostra os micocerosatos C32 (C30 e C34 também podem ser encontrados) associados ao ftiocerol. (Figura cortesia do Dr. Michael Mc. Neil). Adaptado de Brenan, 2011.

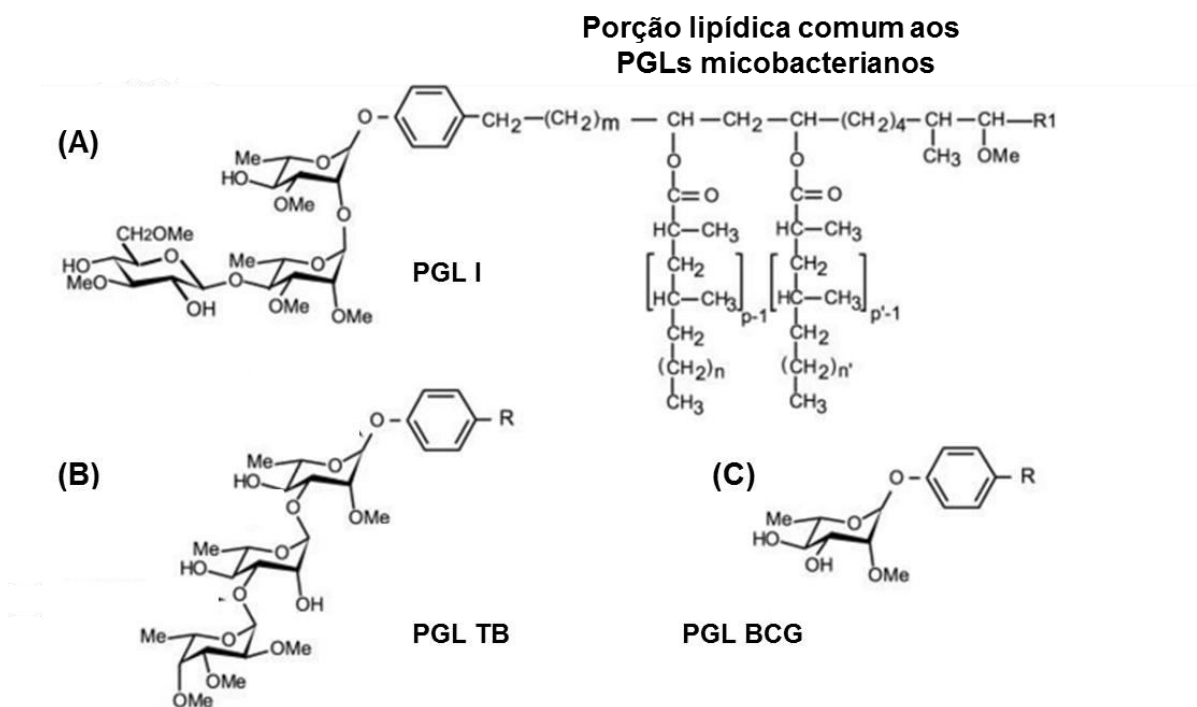


Figura 7. Estrutura química dos diferentes glicolipídeos fenólicos (PGLs) micobacterianos.

(A) PGLI de *M. leprae* (B) PGL de *M. tuberculosis* (C) PGL de *M. bovis* BCG. (R) Estrutura química comum aos PGLs micobacterianos que representa a porção lipídica ligada ao anel fenólico. (Me) grupamentos metila. R1=–CH₂–CH₃ ou –CH₃. Adaptado de Tabouret e colaboradores 2010.

O reconhecimento do PGLI como uma molécula de importância imunológica surgiu neste mesmo período, quando foi observado seu envolvimento na patogenicidade e imunogenicidade de *M. leprae*, tendo sido evidenciado reconhecimento sorológico do PGLI purificado em pacientes com hanseníase lepromatosa (44). A ausência de reatividade no soro de indivíduos controle e de pacientes infectados por *M. tuberculosis* e por outras bactérias atípicas, sugeriu o PGLI como um marcador específico de infecção por *M. leprae* (44). A dissecção dos diferentes constituintes do PGLI mostrou que o componente trissacarídico é a porção que confere imunoreatividade a esta molécula (44). Este trissacarídeo ligado ao núcleo aromático é altamente específico para *M. leprae*. A partir destes achados, o PGLI tem sido utilizado como biomarcador na categorização dos pacientes em PB e MB, a fim de definir o melhor regime de tratamento dos mesmos (44). Os níveis de produção do IgM anti-PGLI indicam exposição ao *M. leprae* e correlaciona-se com a baciloscopia. Dessa forma, esse ensaio pode contribuir para avaliar o nível de exposição dos contatos, auxiliar na classificação dos pacientes, e por fim no monitoramento da eficácia do tratamento (45).

1.6 Interação *M. leprae*-Célula de Schwann

As bactérias patogênicas se ligam à célula hospedeira via adesinas (46). Esta ligação pode ser direta ou inclusive indireta, isto é, quando a bactéria se une a um ligante, e acompanhando o mesmo aproveita um mecanismo de internalização próprio do hospedeiro (46). Nesta seção os mecanismos de adesão, internalização ou interação do *M. leprae* com CS descritos na literatura serão citados. Alguns mecanismos serão detalhados posteriormente em diferentes seções da introdução.

Para alcançar a CS, *M. leprae* precisa interagir com a lâmina basal. Em 1997 Rambukkana resolveu estudar esta interação e fundamentou sua busca nos dados seguintes. A lâmina basal está composta por laminina, colágeno tipo IV, entactina/nidogeno, e proteoglicanos de heparina sulfato como integrinas e fibronectina (47). Considerando a presença constitutiva de laminina ao redor da unidade CS–axônio in vivo (47), laminina pareceu ser um bom candidato como alvo inicial de *M. leprae*. Em 1997 Rambukkana e colaboradores observaram que o tropismo de *M. leprae* envolve a união da bactéria ao domínio G da cadeia $\alpha 2$ da laminina, que serve como ponte entre *M. leprae* e receptores de laminina na CS.

Eles identificaram que o domínio G pode servir como sítio de união tanto para a bactéria como para os receptores humanos. Receptores importantes para laminina são membros da família das integrinas (24,48). Várias integrinas ligam a laminina (24, 48). Rambukkana e colaboradores em 1997 sugerem que $\beta 4$ integrina poderia servir como um receptor de laminina na CS. O mesmo grupo demonstrou em 1998 que alfa distroglicano outro receptor de lamininas tem um papel importante na interação de *M. leprae* com CS. Eles mostraram que *M. leprae* se une especificamente a alfa-DG na presença do domínio G da cadeia alfa 2 laminina de laminina-2. No ano 2000 Ng e colaboradores detalharam ainda mais a interação *M. leprae*-CS, demonstrando o envolvimento do glicolípido PGLI da parede celular de *M. leprae* na interação com CS. Os resultados sugerem que o trissacarídeo terminal de PGLI é responsável pela união à laminina.

Em 1999, Shimoji e colaboradores usando $\alpha 2$ lamininas como sonda, identificaram uma proteína de 28-kDa (ML-LBP21) da parede celular de *M. leprae* como ligante. Usando “beads” cobertos com ML-LBP21 que foram pré-incubados com laminina-2 eles observaram um aumento significativo na adesão e internalização da bactéria. Marques e colaboradores no ano 2000 identificaram uma proteína tipo histona de 21kDa (HLP) que liga laminina e demonstraram que esta era idêntica a ML-LBP21. Vale ressaltar que o sítio de ligação de PGLI e HLP à laminina é diferente. HLP é uma proteína catiônica altamente conservada entre as micobactérias. A capacidade de ligar laminina-2 foi observada também para outras proteínas catiônicas como as histonas. Marques e colaboradores adicionalmente observaram que uma cepa de *M. smegmatis* com mutação no gene de HLP não perdeu a capacidade de adesão à CS-ST8814. Isto indica que existem mecanismos alternativos que *M. leprae* usa para invadir CS. No ano 2001, Suneetha descreveu a proteína Mielin P0 como ligante de *M. leprae* na CS.

Rambukkana e colaboradores nos anos 2002 e 2004 (24,48) descreveram o processo de desmielinização não imune induzido por *M. leprae*. Tapinos e colaboradores em 2006 associaram este processo à ligação direta da bactéria ao receptor de neuregulina ErbB2 que leva a ativação da via ERK1/2 e resulta em proliferação e desmielinização de CS. Ainda não se conhece, porém, o ligante na bactéria que interage com ErbB2.

Em 2002, Oliveira e colaboradores (49) descreveram a habilidade de ligantes derivados de *M. leprae* de induzir apoptose de CS via ligação a TLR2. Eles descreveram que a união da lipoproteína de 19kDa a TLR2 contribui ao dano do nervo por um processo inflamatório.

Em 2010, Teles e colaboradores (50) mostraram a participação da proteína CD209 na adesão e internalização de *M. leprae* em CS primária e de linhagem. É provável que a interação com CD209 seja via Man-LAM presente na parede de *M. leprae*. Eles observaram, no entanto, que a regulação positiva da expressão de CD209 foi observado somente numa sub população das células infectadas com *M. leprae*, sugerindo que existem várias vias envolvidas na internalização do bacilo.

Recentemente, Resende e colaboradores (51) demonstraram um mecanismo adicional de interação de *M. leprae* com a CS. 9-O-acetil GD3 gangliosideo é um glicolípido acetilado presente na membrana celular de diferentes tipos celulares (52) e ele tem um papel importante no desenvolvimento, diferenciação e regeneração do sistema nervoso. Os pesquisadores observaram que a infecção por *M. leprae* leva a regulação positiva da expressão de 9-O-acetil GD3 em CS e demonstraram ainda que esta molécula participa na adesão e internalização de *M. leprae*.

Finalmente, em 2011, Mattos e colaboradores (53) descreveram a importância da sinalização via TLR6 para a fagocitose de *M. leprae*. Eles observaram que em CS TLR6^{-/-} mas não em TLR2^{-/-} a internalização do bacilo se encontrava parcialmente prejudicada. Eles sugeriram um papel para o receptor TLR6 como receptor fagocítico do *M. leprae*, desde que a internalização do *M. leprae* foi parcialmente inibida em CS/TLR6 nocaute. Os dados descritos nesta seção se encontram resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Moléculas presentes em CS que ligam *M. leprae*

Receptores/moléculas na CS	Ligante em <i>M. leprae</i>	Ref.
αDG e Laminina	ML-LBP21	Rambukkana, 1997; Shimoji ,1999
Laminina-2	PGLI	Ng, 2000
Laminina	HLP	Marques, 2000; Soares, 2005
Mielin P0	desconhecido	Suneetha, 2001

TLR2	Lipoproteína de 19kDa	Oliveira, 2002
ErbB2	desconhecido	Tapinos, 2006
CD209	Man-LAM	Teles, 2010
9-O-Acetil GD3 (Gangliosídeo)	desconhecido	Resende, 2010
TLR6	desconhecido	Mattos, 2011

1.6.1 Laminina e PGL I - Atores essenciais na internalização do *M. leprae*

Como mencionado acima, o *M. leprae* interage e invade a CS e este fenômeno representa um passo determinante e inicial para o desenvolvimento das lesões nervosas características da hanseníase. Um grande avanço na compreensão dos mecanismos de interação CS - *M. leprae* veio com o achado de que o tropismo neural do *M. leprae* envolve sua ligação à $\alpha 2$ -laminina (LN-2), isoforma de laminina presente na lamina basal que envolve a CS.

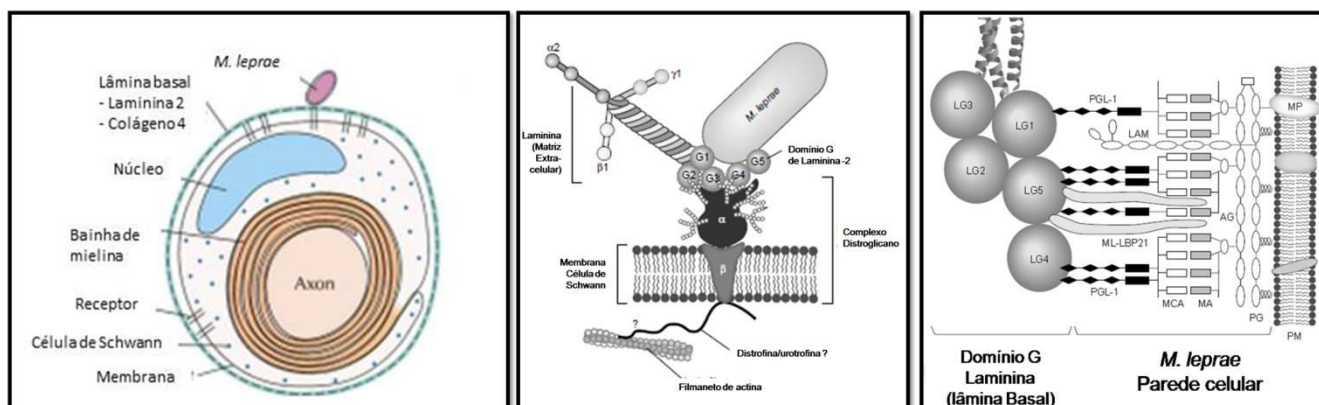


Figura 8. Representação esquemática da interação *M. leprae* com a unidade axônio célula de Schwann (Modificado de Ng, 2000 e de Rambukkana, 2001).

Esta ligação serve como ponte entre o *M. leprae* e os receptores de laminina da CS (54). O envolvimento do PGLI nesta interação foi evidenciado por Ng e colaboradores em 2000 (55). Neste trabalho foi observado que o PGLI se liga a laminina e que esta ligação é dependente da porção trissacarídica da molécula, sugerindo que a presença destes resíduos de açúcar na superfície do bacilo seja importante para o neurotropismo do *M. leprae* (55). Foi evidenciado também que esta interação ocorre via o domínio G da cadeia α da LN-2 (56) (Figura 8). No

entanto, de acordo a Marques e colaboradores (57) outras micobactérias, como o BCG e o *M. smegmatis* aderem a CS e inclusive a lamininas tipo $\alpha 2$. Isto indica que o processo de internalização pode precisar de moléculas adicionais. Partindo do fato que a matriz extracelular parece ser fundamental na interação de *M. leprae* com CS, ela constitui uma fonte ideal para a procura de potenciais ligantes adicionais.

Lamininas são moléculas de adesão que compreendem uma família de glicoproteínas heterotriméricas presentes na matriz extracelular, constituinte importante da membrana basal de diversas células dentre elas a CS (58). Atualmente se conhecem 5 cadeias α , 3 cadeias β e 3 cadeias γ e existem pelo menos 15 isoformas. Cada molécula de laminina é um heterotrímero composto de subunidades de cadeias α , β e γ . Acredita-se que as lamininas tenham um papel no desenvolvimento e regeneração do axônio (58), mas os mecanismos de interação com laminina e ativação e os possíveis efeitos fisiológicos e significados dessa ativação ainda não foram totalmente compreendidos. Os principais receptores de superfície celular para as lamininas são as integrinas e os proteoglicanos, tais como os distroglicanos (DG) e os sindecanos (58).

As integrinas são receptores transmembrana e funcionam como heterodímeros α/β não ligados covalentemente que desenvolvem um papel crítico tanto na adesão célula-célula como na interação célula-matriz extracelular. Existem vários membros da família integrina, como $\alpha 1\beta 1$; $\alpha 2\beta 1$; $\alpha 3\beta 1$; $\alpha 6\beta 1$; $\alpha 7\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ que agem como receptores de laminina em diferentes tipos celulares (58). Inclusive existem na literatura exemplos de colaboração funcional entre integrinas e receptores não integrinas que ligam laminina (58).

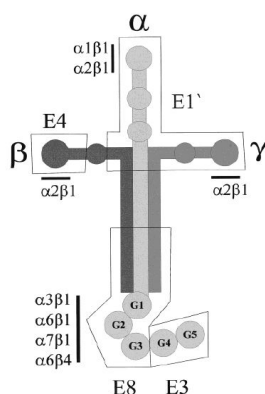


Figura 9. Sítios de ligação de integrinas nas cadeias de laminina α , β e γ .

As integrinas são heterodímero representadas com a combinação das letras α e β . Extraído de Belkin, 2000.

Sítios de união a integrinas foram mapeados nas cadeias α , β , γ de laminina. Na figura 9 podemos observar um resumo dos sítios descritos na literatura (58–60). E3 contem sítios de ligação para distroglicano, sindecano-1 e heparan (58). Além de criar um contato da célula com o ambiente extra celular as integrinas possuem domínios citoplasmáticos que participam de sinalização celular graças à habilidade de se associar e ativar vias de transdução de sinais (58).

Fazendo parte desta rede molecular está a fibronectina que apresenta um sítio de ligação para sindecanos (um proteoglicano condroitin/heparan sulfato) que a permite de agir como co-receptor para integrinas e criar uma resposta de sinalização sinérgica (58).

Os receptores de laminina tipo não-integrina são: distroglicanos, sindecanos e o receptor 37LRP/67LR (58). O distroglicano é composto pela α DG que se associa a β DG na membrana celular. O α DG, tem capacidade de se unir a laminina através das cadeias de laminina α 1 e α 2 (61) e β DG é uma proteína transmembrana cujo domínio citoplasmático se associa com a actina do citoesqueleto.

A família sindecano, que são proteoglicanos de heparan sulfato também medeiam a união a lamininas e regulam a montagem da Matriz Extracelular (ECM) (58). Os sindecanos, assim como as integrinas e os DGs, associam-se com o citoesqueleto de actina intracelular (58). Os sindecanos apresentam várias cadeias laterais de heparan sulfato voltadas para o ambiente extracelular e medeiam a adesão à proteínas de matriz. Somente sindecano-1 é capaz de se associar ao domínio G das cadeias de laminina α 1 e α 2, usando as cadeias laterais de heparan sulfato (58). Sindecano-1 é a principal proteína ligante de heparan de células epiteliais e tem um importante papel na adesão bacteriana, proliferação celular (58).

A molécula 37LRP/67LR foi inicialmente descrita como uma molécula de 67-kD que liga a cadeia β 1 de laminina (63). Foi descrito também que 67LR se regula coordenadamente e se encontra fisicamente associada à integrina α 6 β 4 (62). Além de receptor de alta afinidade de laminina, 67LR age como receptor de internalização de alguns vírus, príons e bactérias (63).

1.6.2 Potenciais ligantes envolvidos no reconhecimento e internalização do *M. leprae* - Destaque para o Receptor de Manose.

Um importante PRR que reconhece a molécula de lectina tipo C, é o receptor de manose (RM), CD206, este receptor já foi descrito reconhecer diversos organismos incluindo bactérias, fungos, vírus e parasitas (64) muitos destes patógenos são intracelulares. O CD206 é um receptor endocítico que se recicla (64). Frequentemente esta estratégia é usada como um mecanismo de liberação de drogas em muitas doenças infecciosas (64). Acredita-se que este receptor promova a infecção micobacteriana, por ser altamente expresso em macrófagos ativado alternativamente (64). Além disto, a ligação a este receptor leva a produção de citocinas anti-inflamatórias e a diminuição da resposta oxidativa (64). Somado a estes fatos a molécula de LAM é coberta por resíduos de manose, e os manosídeos fosfatidil-mio-inositol, são componentes abundantes da parede celular micobacteriana e ligantes do CD206 durante a fagocitose (64). Além disto, a entrada via RM leva a uma diminuição da fusão fagolisossoma, mecanismo utilizado pela célula para eliminar patógenos (65,66). Baetas da Cruz e colaboradores (67,68) mostraram em CS primárias de camundongos e CS da linhagem ST8814 a expressão e funcionalidade do RM. Além disto, eles verificaram que interferon- γ diminuiu a captação de ligantes manosilados por este receptor. Em contrapartida, a dexametasona, um agente anti-inflamatório, regulador da expressão do CD206 teve um efeito oposto (64) .

Recentemente foi sugerido que polimorfismos no gene codificante de CD206, *mrc1* de humanos são fatores associados à suscetibilidade à hanseníase. Neste trabalho foram analisados o papel de polimorfismos no exon 7 do gene *mrc1* em uma família de amostras provenientes do Vietnam e um caso controle do Brasil. Os resultados mostraram que em ambas populações o polimorfismo G396S estava significativamente associado à hanseníase *per se* e a forma MB da doença (69). Entretanto análises funcionais falharam em revelar o impacto deste polimorfismo na captação de zimosam e ovalbumina pelo RM. Além destes dados, foi mostrado na literatura que a super expressão de variantes do RM em células HEK293 falharam em ligar e ingerir *M. leprae* e BCG vivos. Eles concluem com estes resultados, que a interação *M. leprae*-CD206 envolve moléculas adicionais.

Como mencionado acima, micobactérias patogênicas como *M. tuberculosis* e *M. leprae* têm em sua parede celular grande quantidade de lipopolissacarídeos LAM, LM e PDIM. As moléculas de LAM, são cobertas de manose que estão ligadas à porção terminal dos resíduos de arabinose, sendo referidas como ManLAM (70). Já as micobactérias de crescimento rápido tais como *M. smegmatis* e *M. fortuitum*, têm LAMs cobertos por fosfoinositol sendo chamadas de PILAM (70). *M. chelonae* tem suas moléculas de LAM ligadas a arabinose e são conhecidas como AraLAMs (70). Tem sido mostrado que a manose terminal das moléculas de ManLAM liga-se ao receptor de manose tipo lectina-C (70). ManLAMs de diferentes cepas de *M. tuberculosis* ligam-se ao RM com graus de afinidade diferentes sugerindo que o comprimento destes resíduos, isto é, o número de moléculas de manose disponíveis assim como a maneira como o bacilo apresenta estes resíduos ao RM podem variar significativamente, e que isto pode ter um impacto na atividade do RM (64). Além do RM as moléculas de ManLAM podem também ligar a outro receptor presente em células dendríticas conhecido como “dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin” (DC-SIGN) (64). Logo, as moléculas de ManLAM são muito importantes no reconhecimento da célula hospedeira, diferentemente do PILAM de *M. smegmatis* que não é reconhecido por nenhum destes receptores (64).

1.6.3 Desmielinização induzida pelo *M. leprae* e o envolvimento do PGLI.

Novas descobertas com relação ao papel do PGLI na interação CS-*M. leprae* têm sido feitas. Dados da literatura têm mostrado através de estudo *in vitro* com CS de rato, que a infecção prolongada com *M. leprae* altera a morfologia destas células e a expressão de genes que codificam moléculas de adesão celular. Neste mesmo trabalho utilizando um modelo de co-cultura de CS com neurônios foi observado que co-culturas infectadas após a mielinização não tem alteração morfológica na arquitetura da mielina nem na atividade metabólica do *M. leprae* (48).

Contudo, neste mesmo ano, outro grupo mostrou que o *M. leprae* era capaz de induzir em um modelo *in vitro* de cultura de tecido nervoso, assim como *in vivo* em camundongos Rag^{-/-}, ou seja, na ausência de uma resposta imune adaptativa, uma rápida desmielinização do nervo, por um mecanismo dependente de contato (48). Durante a desmielinização induzida pelo *M. leprae*, as CS proliferaram

significativamente tanto *in vitro* quanto *in vivo*, aumentando o número de CS amielínicas, que constituem as células hospedeiras preferenciais do bacilo (48). O fenótipo celular se torna cada vez mais desmielinizado e isto acaba garantindo um nicho intracelular para o *M. leprae* (48). CS mielinizantes, portanto, são resistentes a invasão do *M. leprae*, no entanto, sofrem desmielinização após adesão bacteriana, enquanto SC não mielinizadas sofrem invasão por *M. leprae* em grandes quantidades (48). O mesmo grupo observou também que a viabilidade do *M. leprae* não é necessária para induzir desmielinização *in vitro*. Tanto *M. leprae* γ irradiado quanto a fração de parede celular ou o PGLI foram capazes de induzir desmielinização com uma eficiência parecida à bactéria viva depois de 24 horas de interação.

A CS pode se desdiferenciar, proliferar e re-diferenciar em resposta a via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK levando à injúria do nervo (71). O *M. leprae* intracelular pode ativar ERK por uma via independente de MEK (25). Já no ambiente extracelular, o *M. leprae* ativa a via convencional Ras-Raf-MEK-ERK através de ErbB2, um receptor com atividade tirosina quinase, pertencente à família de receptores do fator de crescimento epidermal (EGF) (72). Estes estudos apontaram que a desmielinização da CS induzida pelo *M. leprae* se deve ao menos em parte, à ligação da micobactéria ao receptor ErbB2 que leva a um fenótipo ainda mais desmielinizante e induz a proliferação da CS (72). A desmielinização e desdiferenciação ocorre através da via Ras-Raf-MEK-ERK. Uma vez a célula desdiferenciada, o *M. leprae* pode então invadi-las e proliferar em seu interior (25,73).

1.7 Efeito imunomodulador de *M. leprae* e o papel do PGLI

Em lesões do pólo resistente da doença (TT) há o predomínio de citocinas produzidas por macrófagos (IL-1 β , TNF, GM-CSF, IL-6), além daquelas pertencentes ao perfil de células Th1 (imunidade celular), como por exemplo, IL-2 e IFN γ . IL-12 é uma das citocinas mais importantes no direcionamento para o perfil Th1. Uma vez diferenciadas, células Th1 expressam o ligante CD40 e secretam IFN- γ , onde esses estímulos ativam macrófagos e levam a produção de substâncias microbidas, como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e enzimas lisossomais, culminando na eliminação de patógenos intracelulares. Adicionalmente, o IFN- γ atua na

formação do granuloma, um eficiente mecanismo para isolamento e contenção da infecção (74).

Sinsimer e colaboradores em 2010 (75) estudaram a modulação da resposta imune inata em monócitos primários infectados com *M. leprae*. Para entender se *M. leprae* falha em induzir uma resposta Th1 ótima ou se interfere ativamente com a indução, eles examinaram as interações iniciais de *M. leprae* e monócitos de doadores saudáveis. Encontraram que nos monócitos “naïve”, *M. leprae* induziu altos níveis de moléculas regulatórias MCP-1 e IL-1Ra (antagonista do receptor de interleucina-1), enquanto suprimiu a produção de IL-6 por mecanismos dependentes de fosfoinositol-3 quinase (PI3K). Adicionalmente, observaram baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias em associação com uma ativação reduzida do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e um atraso na ativação de caspase-1, em monócitos estimulados com *M. leprae* comparados com *M. bovis* BCG.

O PGLI encontra-se envolvido na modulação da resposta imune (76). Foi demonstrado que as células T de pacientes com hanseníase possuem uma baixa resposta proliferativa quando expostas ao PGLI (76). Outro estudo revelou que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) pré-incubadas com PGLI perdem a capacidade de secretarem IL-1 β e também TNF- α em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) (76), sugerindo que o PGLI module negativamente a expressão de citocinas. Observou-se também a capacidade do PGLI de inibir a maturação e ativação de células dendríticas, além de agir como “scavenger” de metabólitos de oxigênio in vitro (76). Manca e colaboradores (77) usando LPS como controle positivo, mostraram que PGLI puro era um estimulador fraco de TNF- α , IL-1 β , e IL-10, enquanto induzia altos níveis de produção de MCP-1 e IL-1Ra, duas moléculas regulatórias negativas associadas com a supressão de IL-12 e IL-1 β , respectivamente (75).

1.8 *M. leprae* e o metabolismo lipídico

1.8.1 *M. leprae* e corpúsculos lipídicos

O *M. leprae* é um patógeno capaz de afetar a homeostase lipídica em células infectadas, levando à formação de organelas citoplasmáticas conhecidas como corpúsculos lipídicos (CLs) (19,78), que são essencialmente os responsáveis pela

aparência espumosa dos macrófagos encontrados em lesões lepromatosas, inicialmente descritas por Virchow em 1863 (14). A origem e natureza dos lipídeos presentes nestes macrófagos foram analisadas por nosso grupo, demonstrando que se trata de CLs clássicos enriquecidos em colesterol e éster de colesterol (79). *M. leprae* é capaz de induzir *in vitro* a biogênese destes corpúsculos e aumentar a captação exógena de colesterol via aumento da expressão de receptores “scavengers” como CD36 em macrófagos (79). Efeito semelhante foi observado em CS (53). Foi observado também que tais corpúsculos são recrutados para o fagossoma contendo a micobactéria, e que a inibição deste recrutamento reduz significativamente a viabilidade do *M. leprae* (53).

De acordo com a literatura os corpúsculos lipídicos constituem reservatórios da enzima COX-2, responsável pela síntese de eicosanóides (18,53,80,81). Estudos recentes do nosso grupo demonstraram que a formação de CLs induzida pelo *M.leprae* está correlacionada com níveis aumentados de Interleucina IL10 e de prostaglandina E2, sendo que IL10 é o imunomodulador principal capaz de regular negativamente a resposta Th1 e atividade bactericida contra patógenos intracelulares (18,19). Além disto, a infecção pelo *M.leprae* reduz os níveis de interleucina IL12 e de óxido nítrico em CS (53). O acúmulo de CLs em CS infectadas, portanto, gera uma resposta imune inata que permite o crescimento dos bacilos no nervo (53).

De fato a regulação do metabolismo lipídico do hospedeiro parece ser essencial para *M. leprae*. Recentemente, foi mostrado pelo nosso grupo, usando modelo *in vitro* e *in vivo* de infecção com *M. leprae*, que o uso de estatinas, uma droga usada no tratamento da hipercolesterolemia, inibidora da primeira enzima da via de biossíntese *de novo* do colesterol, a HMG-Coa redutase, é capaz de diminuir a viabilidade do *M. leprae* (79,82).

1.8.2 O receptor PPAR γ

Espécies patogênicas de micobactérias expressam e regulam diversos genes dentro do hospedeiro para evadir a resposta imune e modular o metabolismo com o fim de se adaptar à vida intracelular. Os receptores ativados de peroxissomas proliferantes (PPARs) são fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares que regulam o metabolismo de lipídeos, a homeostase da

glicose, e inflamação. Estudos recentes demonstraram que a infecção por micobactérias aumenta significativamente a expressão de PPAR γ em macrófagos humanos e murinos, tendo conseqüências importantes para a resposta imune e metabólica do hospedeiro durante a infecção [14,15]. De fato foi observado que a infecção de macrófagos com *M. bovis* BCG ou *M. tuberculosis* dispara um aumento tempo dependente da expressão de PPAR em macrófagos *in vitro* e *in vivo* nos pulmões.

PPARs se caracterizam pelo seu padrão de distribuição nos tecidos e por sua função metabólica (83–85). O termo PPAR deriva de observações iniciais em roedores onde alguns compostos químicos podiam causar a proliferação ou o aumento em número e tamanho de peroxisomos (organelas envolvidas na β oxidação de ácidos graxos). Adicionalmente foi observado que estes mesmos compostos eram capazes de ligar a receptores nucleares. Vale destacar que agonistas de PPAR em humanos não induzem, no entanto, proliferação de peroxisomos (83–85)

Atualmente se conhecem três proteínas da família PPAR, codificadas por genes distintos, sendo: PPAR α , PPAR β e PPAR γ (83–85). Os PPARs são fatores de transcrição dependentes de ligantes, que regulam a expressão de genes-alvo pela ligação a PPRES (elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma) situados em sítios regulatórios de cada gene (83–85)

Os PPARs possuem diferentes domínios funcionais: um domínio de união a ligantes onde os agonistas de PPAR se ligam; um domínio de transactivação que após a união do agonista, sofre uma mudança conformacional permissiva requerida para a heterodimerização com RXR e a ativação transcripcional; e um domínio de união a DNA que interage com a região PPRES do gene alvo (82–84). O receptor liga-se ao PPRES como um heterodímero, juntamente com um fator protéico adicional, o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR). Sob atuação de agonistas, a conformação do PPAR é alterada e estabilizada, criando um sítio de ligação, com posterior recrutamento de coativadores transcripcionais, resultando em aumento na transcrição gênica (82–84). Numerosos ácidos graxos e derivados, incluindo uma variedade de eicosanóides e prostaglandinas, têm sido identificados como ligantes para os PPARs, tendo também sido demonstrado serem alvos para numerosas classes de

compostos sintéticos, utilizados no tratamento do diabetes e dislipidemias (84). Os cofactores transcricionais são moléculas pequenas conhecidas como coativadores ou correpressores, e a resposta transcricional via PPAR depende do recrutamento ou da liberação dessas moléculas respectivamente. Estes cofatores pertencem a uma família de diversos membros como, por exemplo, a proteína que liga PPAR, o coativador de PPAR γ , a proteína que liga ao elemento de resposta de cAMP etc (82–84). Além disso, agonistas sintéticos de RXR podem ativar o complexo e exercer atividade antidiabética similar às observadas com PPARs. É importante também destacar que os PPARs são incapazes de se ligarem ao DNA como monômeros (84).

No contexto do metabolismo lipídico, o fator de transcrição PPAR γ regula a expressão de importantes genes envolvidos em várias funções como o gene *plin2* da adipofilina ou ADRP (85). ADRP é uma proteína estrutural importante dos CLs (e está envolvida no processo de biogênese de CLs e estocagem de lipídeos, devido à sua capacidade de se ligar ácidos graxos estimulando a incorporação destes nas células (82). ADRP já foi detectada em CLs e inclusive é utilizada como marcador de identificação destas organelas (18,19,86,87). Tanigawa (2008) e Mattos (2010) (18,78) detectaram a expressão da proteína ADRP em biópsias de pele e nervo de pacientes com hanseníase lepromatosa.

A importância do PPAR γ no metabolismo humano radica também no potencial terapêutico para os ligantes do PPAR γ . Aterosclerose é uma doença complexa caracterizada pelo acúmulo gradual de lipídeos em células espumosas na placa aterosclerótica. PPAR γ pode afetar na formação destas células espumosas, modulando a resposta inflamatória e influenciando a estabilidade da placa. É importante ressaltar que PPAR γ também pode promover aterosclerose, na medida em que estimula a captação de LDL oxidada, um evento crítico na formação das células espumosas. Sendo assim, os repressores do PPAR teriam um potencial terapêutico para doenças micobacterianas inclusive a hanseníase.

Contrastando com a regulação positiva dos genes alvos descritos anteriormente, a ativação de PPAR pode também reprimir a transcrição. PPAR γ pode reprimir genes pro-inflamatórios, incluindo citocinas pro-inflamatórias e a NO sintase induzível. Os mecanismos moleculares da regulação negativa de respostas inflamatórias são

executados em parte, pela capacidade do PPAR de interferir com as atividades de outros fatores de transcrição dependentes via transrepressão (83-85).

1.9 *M.bovis* BCG recombinante expressando PGLI como ferramenta de análise do papel do PGLI na interação *M. leprae*-CS.

Os relatos da literatura apresentados sugerem que lipídeos micobacterianos, como o PGLI são moléculas importantes na imunopatologia causada pelas micobactérias, em particular pelo *M. leprae*. Em virtude do *M. leprae* não ser passível de cultivo *in vitro*, o estudo do papel do PGLI como molécula fundamental para o desenvolvimento da doença torna-se um importante desafio. Para contornar este problema, recentemente foi construída uma cepa de *Mycobacterium bovis* BCG reprogramado para sintetizar PGLI como constituinte da parede celular (BCGPGLI) (76). O *M. bovis* BCG foi escolhido para a reprogramação pelo fato dos seus constituintes lipídicos da parede celular serem semelhantes aos do *M. leprae*, no entanto, o glicolipídeo próprio do *M. bovis* (mycosídeo B) foi substituído pelo PGLI. Tabouret e colaboradores (76) mostraram que o BCGPGLI possui uma maior capacidade de ser fagocitado por macrófagos e células dendríticas humanas do que o BCG contendo o vetor vazio (BCGWT). Os autores deste trabalho mostraram também que o BCGPGLI diminui a secreção de TNF- α em macrófagos e a ativação de NF-kB (76). Posteriormente, este mesmo grupo mostrou que monócitos humanos expostos ao BCGPGLI apresentam uma maior produção de IL-12 e TNF- α , sugerindo que, dependendo do tipo celular, o PGLI pode modular de forma positiva ou negativa a expressão de citocinas (76). A cepa de BCGPGLI mostrou também possuir uma maior capacidade de sobreviver dentro de monócitos e macrófagos do que o BCGWT (76).

JUSTIFICATIVA

A hanseníase quando não tratada ou tratada tardiamente pode causar incapacidade ou deformidades. As lesões neurológicas que resultam em perda sensorial e sensório-motora em pacientes com hanseníase como consequência da infecção de células da glia do SNP, isto é, CS, não podem ser revertidas com o uso da poliquimioterapia.

O papel do PGLI parece ser crucial para a invasão, sobrevivência e proliferação de *M. leprae* num ambiente intracelular. A nossa hipótese postula que a internalização de *M. leprae* em CS envolve moléculas além da laminina e que após a internalização o PGLI participa da modulação de vias de sinalização e processos metabólicos como por exemplo, a formação de corpúsculos lipídicos. Portanto, o presente trabalho propõe o estudo do papel do PGLI na interação do *M. leprae* com CS, usando como ferramenta a cepa recombinante de BCGPGLI, cedido pelo Dr. Christophe Guilhot, do “Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale”, Toulouse, França.

Serão utilizados também PGLI, o derivado ND-O-BSA ou PGL de *M. tuberculosis* (PGLTB) doados pelo BEI resources, NIAID, NIH, para avaliar a interação destes lipídeos micobacterianos com CS.

Com estas ferramentas será investigado se o PGLI é capaz de mediar adesão, invasão, modulação da expressão de fatores inflamatórios assim como o seu envolvimento como molécula moduladora do metabolismo lipídico em CS. A compreensão das bases bioquímicas e moleculares pelas quais o *M. leprae* invade o SNP e induz a neurodegeneração, é de fundamental importância para a prevenção da progressão da hanseníase. Estratégias terapêuticas alternativas que somadas ao uso de antibióticos possam eficazmente combater ou prevenir as injúrias neurológicas, são foco de diversas pesquisas atualmente. Estudar o papel do PGLI pode nos ajudar a atingir esse objetivo.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar o papel do PGLI como fator de virulência na interação do *M. leprae* com células de Schwann.

Objetivos Específicos

1. Confirmar a participação do PGLI na adesão e internalização do *M. leprae* em células de Schwann da linhagem ST8814 e células de Schwann humanas primárias.
2. Analisar a influência da viabilidade das micobacterias internalizadas na invasão e modulação fenotípica da célula de Schwann.
3. Analisar a influência do PGLI na formação de corpúsculos lipídicos em células de Schwann.
4. Buscar receptores ou moléculas candidatos que ligem PGLI em extratos enriquecidos em proteínas de membrana ou de citosol de células de Schwann.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micobactérias

Amostras de *M. leprae* Thai-53 viáveis isolados de coxim plantar de camundongos atímicos BALB/c (*Nu/Nu*) são doados mensalmente pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil.

Camundongo atímicos ou nude (*nu/nu*) é uma linhagem de camundongos com mutação gênica desativando o gene *foxn1*, o que resulta em timo deteriorado ou ausente, ocasionando a inibição do sistema imune devido ao número reduzido de células T. Os camundongos nude podem receber diferentes tecidos e enxertos por não haver resposta de rejeição. A falta de pelo característica da linhagem proporciona a denominação “nude”. A purificação do *M. leprae* a partir do coxim plantar de camundongos nude infectados é realizada mensalmente pelo técnico de laboratório e ocorre após a infecção da pata dos camundongos atingir uma carga bacilar de cerca de 10^9 - 10^{10} /g de tecido. A pata infectada é removida, imersa em iodo 20% por 20 minutos e rinsada com álcool 70%, sendo posteriormente fragmentada. As patas são mantidas em meio RPMI (LGC Biotecnologia) com 10%SFB (SFB-Cripion Biotecnologia LTDA) a 4 °C e são enviadas ao laboratório de Microbiologia Celular – Pav. de Hanseníase (Fiocruz-RJ) para purificação. Os tecidos são fragmentados picando em pedaços menores com tesoura pequena e pinça estéreis. Os fragmentos são transferidos para uma placa de 6 poços, aos quais se adiciona meio RPMI 1640. Adiciona-se solução de colagenase-dispase 2x no poço em uma proporção 1:1 com o meio já no poço em conjunto com uma solução de ampicilina (Sigma-Aldrich, EUA) com concentração final de 50µg/mL. Homogeniza-se a placa por agitação suave e incuba-se a placa por 2 horas a 33°C. Após a incubação, homogeniza-se novamente com o auxílio de uma ponteira de 1000µL e transfere para tubos eppendorfs de 1,5 mL. Em seguida realiza-se uma centrifugação de 14000rpm por 5 minutos, em que se descarta o sobrenadante e se lava o pellet duas vezes com água estéril livre de pirogênio. Posteriormente, dissolve-se o precipitado com uma solução de NaOH 0,1N estéril e então centrifuga novamente a 14000rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante. Em seguida, dissolve-se o precipitado com 1mL de meio RPMI 1640 estéril e homogeniza o

material com o auxílio de uma seringa de insulina de 1mL para remover os grumos. (Adaptado de Trombone, 2014).

Os bacilos são quantificados por contagem direta após coloração pelo método de Kinyoun e conforme descrito por Shepard e McRae (1968) e a viabilidade medida pelo método Live/Dead BacLight, como será descrito posteriormente.

M. bovis BCG recombinante expressando PGL I (BCGPGLI), PGLTB (BCGPGLTB) ou BCG selvagem com o plasmídeo vazio (BCGWT) foram cedidos gentilmente pelo Dr. Christophe Guilhot, Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, Toulouse, França. Eles foram cultivados em meio líquido Middlebrook 7H9 (DIFCO laboratories, EUA) suplementado com 0,05% de Tween 80 (DIFCO laboratories, EUA) e com 10% Middlebrook ADC (albumina bovina, dextrose e catalase) assim como contendo 50µg/mL kanamicina.

O tempo de cultivo foi de aproximadamente 15 dias, sob constante agitação, à temperatura de 37 °C. Ao atingir aproximadamente $DO_{600} = 0,8$ correspondente à fase exponencial do crescimento micobacteriano, o cultivo foi interrompido e aliquotado em 20% glicerol e estocado em freezer -70 ° C para posterior uso em ensaios de infecção. Para a utilização nos ensaios de infecção, as alíquotas congeladas de *M. bovis* BCG em 20% glicerol foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 min e ressuspensas em meio RPMI-1640 sem adição de antibióticos. No caso do *M. bovis* BCG recombinante com plasmídeo expressando “Green Fluorescent Protein” o antibiótico empregado foi a higromicina (50µg/mL).

Tanto para *M. leprae* como *M. bovis* BCG a qualidade da cultura foi avaliada pela coloração de Kinyoun e por testes de contaminação em meio agar sangue e/ou agar LB. A cultura foi determinada livre de contaminação, quando observados apenas bacilos corados com fucsina (em rosa) e se não houver crescimento de bactérias ou fungos em 48h no meio agar. Para a coloração de Kinyoun foram adicionados 10 µL da cultura em lâmina de vidro com área circular marcada. Depois de seco, o esfregaço foi fixado por calor. Posteriormente a lâmina foi coberta com fucsina 5 min. O excesso de fucsina foi retirado por lavagem delicada em água corrente e em seguida adicionado solução álcool-ácido para descoloração. Após lavagem em água corrente, foi adicionado azul de metileno por cerca de 30 segundos. Após essa etapa, a lâmina foi novamente lavada, e após secagem a temperatura ambiente, foi levada para avaliação com lente de imersão usando o

microscópio Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) em aumento de 100 x ou 60x. Este microscópio se encontra no Pavilhão de Hanseníase e a contagem de bacilos foi padronizada para o microscópio e os aumentos 60x ou 100x. Parte de cada leva de *M. leprae* recebida foi letalmente irradiado por irradiação γ . Os BCG recombinantes foram submetidos ao mesmo processo. Para isto, os tubos eppendorfs de 1,5mL foram transportados no interior de tubos de polipropileno de 50mL com gaze. O material foi levado para a Acéletron (Acelétrica Comércio e Representações Ltda., Rio de Janeiro, RJ), onde os bacilos foram submetidos a radiação ionizante de 15 kilogray. Os experimentos que comparam bacilos vivos versus mortos foram realizados com o mesmo lote de bactéria viva ou morta.

4.2 Avaliação de viabilidade micobacteriana

A confirmação da viabilidade bacteriana do *M leprae* foi avaliada usando o kit de coloração LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits (Invitrogen, USA) conforme recomendações do fabricante. O kit é composto por dois marcadores de ácidos nucleicos: SYTO9 e o iodeto de propídeo. Para isso, 10 μ L da suspensão bacteriana em PBS (tampão fosfato 10 mM pH 7.2 contendo 150 mM NaCl) foram avolumados a 100 μ L com PBS. Foram adicionados então 0,8 μ L do fluoróforo A (SYTO® 9, verde fluorescente) + 0,8 μ L do fluoróforo B (iodeto de propídeo, vermelho fluorescente). As suspensões foram incubadas por 15 min. a temperatura ambiente ao abrigo da luz, sendo então centrifugadas por 10 min. a 16.000xg. O sobrenadante foi descartado e as bactérias lavadas com PBS. Finalmente as bactérias foram resuspendidas em pequeno volume de PBS (10 μ l), sendo em seguida transferidas para lâminas de microscopia, cobertas com lamínulas e observadas ao microscópio de fluorescência em objetiva de imersão de 100x.

O SYTO9 (excitado a 488 nm e emitido a 525 nm) penetra tanto nas bactérias viáveis quanto nas não - viáveis, enquanto o iodeto de propídeo (excitado a 488 nm e emitido a 560nm) penetra somente em bactérias com membrana plasmática danificada. Desta forma, a bactéria incubada na presença dos dois marcadores, simultaneamente, fluorescerá na cor verde, se viável, e na vermelha, se inviável. Através da microscopia de fluorescência, bactérias vivas e mortas foram quantificadas por contagem dos bacilos verdes e vermelhos, respectivamente.

4.3 Cultivo e manutenção de CS humanas primárias e da linhagem ST8814

A linhagem de CS humanas ST8814 foi isolada de um paciente com neurofibromatose tipo I e doada pelo Dr. Jonathan A. Fletcher (Harvard Medical School, Boston, EUA). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10 mM de HEPES, 1 mM de L-Glutamina (Invitrogen) pH 7,4, e adicionado 10% de soro fetal bovino (SFB-Cripion Biotecnologia LTDA). As culturas foram mantidas em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Para o início do cultivo, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C, adicionadas em um volume de 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4 °C para a retirada do crioprotetor DMSO (dimetil sulfoxido – Sigma Chemical Company) e então 1x10⁶ células foram ressuspensas novamente em meio RPMI suplementado, sendo cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca) em 5% de CO₂ a 37 °C até obter uma confluência de 90%. As CS-ST8814 são aderentes e a sua manutenção foi feita por repiques retirando o sobrenadante da cultura, lavando a monocamada com PBS, ressuspensando as células adicionando 1 mL de tripsina (0,125%) (Invitrogen) e levando-as à estufa por 1 à 2 minutos. Em seguida, 3 mL de meio RPMI suplementado foi adicionado e a suspensão centrifugada à 1500rpm por 10 minutos a °C. As células foram ressuspensas, contadas em câmara de Neubauer e cada 1x10⁶ células foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI suplementado e transferidas a novas garrafas de cultura de 25 cm². Após a sexta passagem, as culturas foram desprezadas e nova alíquota estoque da linhagem foi descongelada e o cultivo reiniciado. Esta linhagem é estocada em nitrogênio líquido no Laboratório de Microbiologia Celular da FIOCRUZ em alíquotas de 1mL de solução de congelamento (90% de SFB, em 10% de DMSO).

As células primárias foram adquiridas da empresa ScienCell Research Laboratories, Catalog #1700. Foram cultivadas em Schwann Cell Medium (Catalog #1701) em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Dada sua natureza aderente, a fim de realizar os repiques, as células foram soltas usando tripsina durante 1minuto a 37°C. Para o plaqueamento as células foram quantificadas na câmara de Neubauer

e tinham a viabilidade celular aferida pelo método de exclusão por coloração pelo Azul de Tripán (Sigma-Aldrich). Células de Schwann da linhagem ST8814 são armazenadas e estocadas em criotubos no nitrogênio líquido, em 1mL de solução de congelamento, 90% de soro fetal bovino (SFB, Cripion Biotecnologia LTDA) em 10% de DMSO.

4.4 Marcação de *M. leprae* com o fluoróforo PKH 26 (vermelho) ou PKH 67 (verde).

Para os experimentos de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, as micobactérias foram marcadas com o fluoróforo PKH (Sigma) seguindo o protocolo do fabricante. Para isso, o corante era diluído no diluente fornecido pelo fabricante (0,5 µl de corante para 100 µl de diluente). O corante diluído era então adicionado ao “pellet” de micobactérias e incubada por 2 min. ao abrigo da luz a temperatura ambiente. Para deter a reação era adicionado 500 µL de RPMI +10% SFB (Cripion) e centrifugado por 15 min/16.000xg e o sedimento era ressuspensionado em PBS e centrifugado novamente. Os bacilos marcados foram ressuspensionados no volume de meio de cultura desejado para a realização das infecções.

4.5 Protocolo para recobrir partículas de látex ou “beads” de latex com glicolípídeos

Ressuspender PGLI seco da BEI Resources (NR-19342) em tampão bicarbonato de sódio 0,05M pH 9,6 por sonicação. Pegar 10 µL de “beads” com concentração de 1×10^{10} /mL (Sigma LB-30) e avolumar para 100 µL com tampão bicarbonato de sódio 0,05M (pH 9.6). Adicionar 100 µg de PGLI e avolumar para 500 µL com tampão bicarbonato de sódio (pH 9,6). Incubar por 3 horas a temperatura ambiente (dar batidas no eppendorf de 5 em 5 minutos). Centrifugar a 14000rpm (15 minutos) e descartar o sobrenadante. Avolumar para 100 µL de PBS virgem e estéril com 2% de BSA. Deixar bloqueando por 2 horas a temperatura ambiente. Centrifugar a 14000rpm (15 minutos) e descartar o sobrenadante. Avolumar para 100 µL de PBS virgem e estéril e estocar a 4°C. (Adaptado de Rambukkama, 2000). Os “beads” são partículas coloidais com carga negativa, pelo que a interação com os ligantes neste protocolo é por carga. O mesmo procedimento foi utilizado para

recubrir os “beads” com PGLTB (NR-36510, BEI Resources) ou LAM de *M. leprae* (NR-19348, BEI Resources). Para os experimentos de espectrometria de massa, o passo do bloqueio com BSA foi eliminado, já que o BSA interfere produzindo um sinal forte no MS.

4.6 Monitoramento do grau de fagocitose

A interação das micobactérias ou beads de látex com a CS da linhagem ST8814 foi monitorada por citometria de fluxo. As CS da linhagem foram infectadas com micobactérias marcados com o corante PHK 67 verde ou PKH 26 (vermelho) (Sigma) com diferentes índices de multiplicidade de infecção ou MOI (bactéria: células ST8814). “Beads” fluorescentes verdes de 1 µM de diâmetro foram usados em alguns ensaios (Sigma). O tempo de incubação variou de acordo ao ensaio, sendo principalmente 4h, 12h, 24h ou 48h. Após a incubação as células foram lavadas com PBS e depois soltas com tripsina e mantidas em PBS com 2% SFB. As células foram analisadas usando o citômetro de fluxo Accuri C6 (Accuri Cytometers, Inc.) disponível no prédio de Hanseníase e a fluorescência detectada pelo canal FL1 (verde) ou FL2 (vermelho) após adquirir 10.000 eventos. A leitura no FL1 foi feita com e sem corante vital Azul de Tripán (0,4%) com o objetivo de distinguir células contendo bactérias aderidas e/ou internalizadas. Neste ensaio, denominado ensaio de “quenching”, o corante é adicionado para “apagar” a fluorescência das bactérias extracelulares (89). O percentual de células associadas à bactérias (adesão + internalização), bem como o percentual de células contendo apenas bactérias internalizadas (fagocitose) foi determinado a partir de culturas não infectadas. A intensidade média de fluorescência (MIF) também foi avaliada. A análise quantitativa dos dados obtidos foi realizada pelo programa Software *CFlow Plus*[®].

4.7 Detecção e quantificação de corpúsculos lipídicos (CLs)

A quantificação dos corpúsculos lipídicos produzidos pelas CS foi feita plaqueando cerca de 40.000 CS/poço sobre lamínula de vidro (CORNING) em placas de cultura de 24 poços. As culturas foram mantidas a 2% SFB/33°C e infectadas ou não com micobactérias, estimuladas com “beads” e tratadas ou não com drogas. Após 48h do estímulo ou da infecção as células foram lavadas com

PBS 1X, fixadas com paraformaldeído 4% durante 20 minutos a 4°C e lavadas com PBS 1X por duas vezes. Os CLs foram evidenciados utilizando: tetróxido de ósmio (OsO_4) e Óleo Vermelho - Oil Red O (ORO) .

Marcação com ORO: as células foram recobertas com propilenoglicol 100% por 5 minutos após a remoção deste, foi adicionado ORO (0,5% em propilenoglicol) durante 7 minutos, passado este tempo o ORO foi retirado e acrescentou se propilenoglicol 85% por 3 minutos, posteriormente as lamínulas foram lavadas com água destilada. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de microscopia utilizando-se resina sintética (Entellan®, Merck). O núcleo celular foi marcado com 4', 6- diamino- 2- fenilindol (DAPI). Os corpúsculos lipídicos foram visualizados em vermelho e o núcleo marcado em azul empregando o microscópio de fluorescência Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) usando o programa AxioVision Rel. 4.8. A quantificação dos corpúsculos lipídicos foi feita usando o software ImageJ junto com um Macro desenhado para quantificação simultânea de múltiplas imagens obtidas usando o canal vermelho do microscópio de fluorescência. O índice de “área de corpúsculo lipídico/célula” foi calculado dividindo-se o valor de área de corpúsculos obtido pelo programa pelo número de células presentes no campo analisado. Estudamos 500 células para cada condição analisada e foi feita uma média dos valores de área de corpúsculos lipídicos/célula. Todos os experimentos foram feitos com pelos menos 3 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas.

Marcação com Tetróxido de Ósmio: OsO_4 estabiliza e constrata especialmente os fosfolipideos constituintes de membrana. Atua principalmente sobre os ácidos graxos insaturados. As células fixadas foram tratadas com 2 gotas de ácido cacodílico 0,1M e 2 gotas de ósmio a 1,5% e incubados por 30 minutos, no escuro. Durante este tempo foi preparado tiocarbohidrazida 1% (TCH) em H_2O destilada. Foi diluído na proporção de 10:1 (50mg/5mL), \pm 1 minuto sob aquecimento, a solução deve ficar rosada. Após os 30 minutos, foi feita uma lavagem com H_2O destilada. Foram pingados 2 gotas de TCH 1% e incubados por 3 minutos seguido por 2 lavagens com H_2O destilada. Foram pingados 2 gotas de ácido cacodílico e 2 gotas de ósmio 1,5% incubados por 5 minutos seguido por 2 lavagens com H_2O destilada.

A formação de corpúsculos lipídicos foi avaliada através da visualização em microscópio Axio Observer Z1 (Carl Zeiss).

4.8 Marcação de superfície e intracelular do Receptor de Manose:

A expressão do receptor de manose intra e extracelular na célula de Schwann ST8814 foi avaliada pelas técnicas de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Cerca de 40.000 CS/poço foram plaqueadas em placas de 24 poços. As culturas foram mantidas a 2% SFB à 33°C e infectadas ou não com micobactérias, estimuladas com “beads” de látex (revestidas ou não com LAM) e tratadas ou não com GW9662 (CAS 22978-25-2) ou siRNA (ver item silenciamento). Os tempos e as concentrações são detalhados nos ensaios. Após a incubação com o estímulo (“beads” ou bactérias), para os ensaios de microscopia, as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com paraformaldeído 4% durante 20 minutos a 4°C e lavadas com PBS 1X por duas vezes. Para os ensaios de citometria de fluxo as células foram coletadas usando EDTA 5mM, lavadas e fixadas com paraformaldeído 4% e lavadas com PBS1X. As células foram incubadas com solução de permeabilização 1X (Becton Dickinson-BD) (200µL/poço) por 10 minutos a temperatura ambiente. Após retirar a solução de permeabilização as células foram lavadas duas vezes com PBS com 1% de SFB. Acrescentou-se o anticorpo anti-CD206 conjugado com FITC (clone15-2, Mouse IgG1, κ1, Biolegend) ou o isotipo conjugado com FITC a 4°C “overnight” e ao abrigo da luz. Para este ensaio foi feita uma titulação para determinar a diluição ideal do anticorpo e a partir daí a diluição ótima empregada para os ensaios foi de 1:5 de anticorpo diluído em PBS+SFB 1%. Após o período da incubação foi efetuada a lavagem com PBS+BSA 1% por duas vezes, seguido por uma lavagem com PBS+SFB 10%. No caso de microscopia as lamínulas foram montadas como anteriormente descrito e analisados por microscopia de fluorescência (Zeiss). Para a citometria as células foram analisadas no canal FL1 usando o citômetro de fluxo Accuri C6 (Accuri Cytometers, Inc.)

4.9 Quantificação de citocinas em sobrenadantes de cultura.

Sobrenadantes de culturas de SC incubadas com *M. leprae*, BCG recombinante ou beads foram coletados. Um conjunto de citocinas foi quantificado através do sistema MULTIPLEX ou pela técnica de ELISA (IL-8).

4.10 Análise da expressão de proteína por Western Blot.

Para avaliar a expressão de proteínas de culturas de células com os diferentes estímulos, as células foram lisadas com tampão “RIPA” (50mM TRIS pH= 7,5; 1% Novidet p40; 0,25% Deoxicolato de sódio; 0,1% de SDS) gelado complementado com inibidores de proteases (Roche, USA). Alternativamente foi utilizado o Tampão de lise gelado com 10mM Tris HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% Glicerol, 10mM DTT, 0.5% triton X-100 complementado com coquetel de inibidores de protease. Neste protocolo as amostras são colocados a -20°C overnight. No dia seguinte descongelados e sonicados durante 10 minutos finalizando com um “spin” de 5 minutos a 4°C. As proteínas foram dosadas pelo método BCA (Thermo Scientific, USA). Foram utilizadas 20µg de proteína, essas amostras foram diluídas em tampão de amostra e foram fervidas por cinco minutos. (Tampão de amostra 5x pH6.8:Tris HCl 156.25mM, glicerol 25%, beta mercaptoetanol 12.5%, SDS 5%).

As amostras foram aplicadas num gel de poliacrilamida 12% ou 15% para a eletroforese em gel. Após a corrida as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose coradas com Amido Black, para saber se a transferência foi realizada de forma eficaz. Posteriormente a membrana foi bloqueada com 5% de BSA (albumina de soro bovino) em TBS- tween 20 (TBS-T) por duas horas. Após o bloqueio foi feita a incubação com anticorpo primário diluído em 5% de BSA/TBS-T por duas horas. As concentrações dos anticorpos primários são diferentes para cada anticorpo, dependendo do que é indicado pelo fabricante e pelos testes realizados. A membrana é lavada com 6 lavagens de 5 minutos, sendo três com TBS-T 1X e outras três com TBS 1X. O anticorpo secundário conjugado a peroxidase é diluído em 5% de BSA em TBS-T, com concentração de 1:40.000. A membrana é submetida novamente a lavagens, e a reação é revelada por quimioluminescência usando o kit “ECL” (Amersham Biosciences, UK) seguindo as normas do fabricante. Os anticorpos usados foram da empresa Santa Cruz Inc. PPAR γ (H-100) SC-7196 (coelho). GAPDH (H2114) SC-32233 (camundongo).

4.11 Extração de RNA de células de Schwann.

As culturas de ST8814 não infectadas, estimuladas com micobactérias mortas ou beads ou infectadas com micobactérias vivas, foram lavadas com PBS. Em seguida

foram lisadas com 1 mL de TRIzol® (Life technologies ,USA) para a obtenção do RNA total celular. Foi realizada a homogeneização dos lisados por pipetagem, sendo os mesmos posteriormente recolhidos para microtubos livres de RNase. Cada tubo foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio, as amostras agitadas vigorosamente por 15 segundos, e deixadas em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4° C. Foi transferido o sobrenadante (fase aquosa superior) para um novo tubo de 1,5 mL. Cuidar para não coletar o DNA (fase intermediária) nem proteínas, lipídios e restos celulares (fase orgânica inferior). Foi adicionado 500 µL de isopropanol e com agitação manual vigorosa. Não usar vortex. As amostras foram armazenadas a - 70° C “overnight”. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C a 12.000xg por 20 min, formando um sedimento gelatinoso no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% (v/v) em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), homogeneizado e centrifugado a 10.000 xg por 10 min a 4°C. Por fim, foi removido o sobrenadante e o RNA ficou secando a temperatura ambiente. O RNA foi ressuspensão em 20µL de água RNase-Free Water (RF) i.e, tratado com DEPC. As amostras foram armazenadas no freezer a - 70° C até o momento do experimento. (Protocolo adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

4.12 Tratamento com desoxirribonuclease (DNase).

O RNA extraído foi quantificado utilizando o Nanodrop (ND-100, Thermo Scientific). O RNA foi posteriormente submetido a um tratamento com DNase utilizando o kit TURBO DNase-free (Ambion). A 3 µg de RNA foram adicionados 2 µL de enzima DNase e 3 µL de tampão 10x, avolumando-se com água-DEPC para 30 µL. As amostras foram incubadas por 30 min a 37 °C e logo após, foram adicionados aos tubos 6 µL de reagente de inativação, sendo as amostras incubadas a temperatura ambiente por 2 min. sob constante homogeneização. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 16 000 xg / 1 min e o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, para prosseguir com a quantificação no Nanodrop (ND-100). A análise Qualitativa do RNA É realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante preparado com tampão MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico) em água RF. Para o preparo das amostras foi acrescentado Mix amostra

(azul de bromofenol, formamida e MOPS) e SYBR Green. As amostras foram aquecidas a 65 °C no banho seco por 15 min, para então serem aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada aplicando-se uma diferença de potencial de 110 V por 30 min e as bandas referentes às subunidades 18S e 28S foram visualizadas em transiluminador UV.

4.13 Síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA total por transcrição reversa (RT).

A reação de transcrição reversa para a síntese de do cDNA a partir do RNA foi realizada utilizando o kit RevertAid first strand cDNA synthesis (Thermo Fischer Scientific). Para a reação foram utilizados cerca de 1000, 500 ou 250 ng de RNA ao qual adicionou-se água-DEPC para completar o volume de 11 µL e adicionou-se 1 µL de OligodT. Preparou-se também um controle negativo onde não foi adicionada amostra, mas sim 11 µL de água-DEPC. As amostras foram incubadas a 65 °C por 5 minutos em banho seco e em seguida foram adicionados a cada amostra 4 µL de tampão de reação 5x, 1 µL de Ribolock RNase inhibitor, 2 µL de DNTP e 1 µL da enzima transcriptase reversa, as mostras foram então incubadas a 42 °C por uma hora, seguida de incubação a 70 °C por 5 minutos para a inativação da enzima e as amostras foram acondicionadas a -70 °C.

4.14 PCR em tempo real

Para a análise da expressão dos genes *mrc1*, *cd36* e *adrp* a nível transcricional, as amostras de cDNA foram diluídas para a concentração de 5 ng/µL. O mix de PCR foi preparado utilizando o kit SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) e consistia em 5µL de master mix, os primers senso e antissenso na concentração de 400 nM e 10 ng de material genético. Utilizou-se água livre de RNase para avolumar e completar o volume final de reação de 10µL. Em seguida, os mix foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços (Applied Biosystems) em duplicata. Além do controle negativo da RT, foi preparado um controle negativo da PCR, onde não foi adicionado cDNA mas, em seu lugar, foi adicionado de água. A placa foi submetida a uma rápida centrifugação e então foi disposta na máquina StepOnePlus®-Applied Biosystems, ajustada para o método comparativo por $\Delta\Delta CT$,

sistema de detecção para SYBR Green, para então realizar a reação por 2h. As amostras foram submetidas ao seguinte padrão de ciclagem: 95°C para desnaturação por 10 minutos seguidos de ciclos alternados de 15 minutos a 94°C de desnaturação e 1 minuto a 60°C para anelamento/extensão. Em seguida foi realizada a curva de dissociação aquecendo-se as amostras a 95°C por 15 minutos, resfriando-se e seguida a 60°C por 1 minuto e aquecendo-se lentamente até as amostras atingirem novamente 95°C, sendo incubadas nesta temperatura por 15 minutos. Terminada a reação, os resultados foram analisados. As sequências dos iniciadores utilizados estão representadas na Tabela 2. A expressão dos genes foi normalizada pela expressão de um gene constitutivo (RPL13).

Tabela 2: Sequências dos iniciadores senso e anti-senso de cada gene utilizados na reação de PCR para células ST8814.

For-PLIN2	5' GTGAAGACCATCACCTCCGT '3
Rev-PLIN2	5' TGTCTAGCCCCCTTACAGGCA '3
For-CD206	5' TGGTGAAGAAGAAGCAGTC '3
Rev-CD206	5' TAGTCAAGGAAGGGTCCGAT '3
For-CD36	5' TCTTATGGACTGTTGCTGGG '3
Rev-CD36	5' TTCTTGACTGAACCTGATCCA '3
For- RPL13	5' GACAAGAAAAGCGGATGGT 3'
Rev- RPL13	5' GTA CTTCCAGCCAACCTCGT 3'

4.15 Silenciamento com siRNA para *mrc1*

Para o silenciamento, as células devem estar plaqueadas com 50% de confluência em meio com 10 % de SFB sem antibiótico. No caso de CS foram plaqueadas 30.000 células/ poço em placa de 24 poços. No dia seguinte foi feito o processo de transfecção. Para cada poço se deve preparar um mix (1) contendo 50 µL OptiMEM e 1 µL Lipofectamina, assim como um mix (2) contendo 50 µL OptiMEM e 0.4 µL siRNA. Seguidamente se deve deixar mix 1 e mix 2 por 5 minutos a T ambiente. Após este tempo, foram misturados mix1+mix 2 e deixados a T ambiente por 20 minutos. O stock do siRNA deve estar a 50µM. Foram utilizados dois siRNA para avaliar independentemente o silenciamento do gene. Os siRNA utilizados foram *mrc1* & *mrc1* (# AM16708, Ambion, Life Technologies, USA) . Adicionalmente foi utilizado um “scramble” siRNA como controle negativo. Foi colocado 100µL do mix

por poço e adicionado 400µL de RPMI + 10% SFB. A cultura foi colocada por 24h na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24h de transfecção foi trocado o meio e após uma lavagem com PBS1X foi colocado 500µL de RPMI + 2% SFB por poço. Para os experimentos de internalização as bactérias foram marcadas com PKH 67 como previamente descrito e o grau de fagocitose foi avaliado após 48h de incubação com as bactérias. Para avaliar o nível de expressão de CD206 foi determinado empiricamente que o melhor tempo corresponde a 24h após incubação com as bactérias.

4.16 Análise estatística

Os resultados dos ensaios tiveram suas médias aritméticas e erros padrões das médias calculadas. Diferenças estatisticamente significativas entre os valores foram determinadas com o uso do programa GraphPad Prism 5 Project, aplicando os testes One-way analysis of variance (ANOVA) seguido do teste Bonferroni. Em alguns casos foi usado o teste t-student. Foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

4.17 Espectrometria de Massa Orbitrap

Resumidamente, 1×10^8 Beads (Sigma LB-30) recobertos com PGLI foram incubados com 500mg de extrato enriquecido em proteínas de membrana de CS por 3hs a temperatura ambiente. As proteínas foram obtidas usando o kit (Calbiochem Cat. #71772-3). Mediante um “spin down” foram separados os beads com ligantes. As proteínas que ligaram foram submetidas a digestão em solução. Os peptídeos foram desalinizados e concentrados em colunas e enviados para análise.

4.17.1 Interação entre PGLI e extractos enriquecidos em proteínas de membrana ou de citosol de células de Schwann humanas.

CS da linhagem ST8814 foram cultivadas in vitro em garrafas contendo 1×10^7 células. As células foram lavadas com PBS e soltas da garrafa usando 20 mL de EDTA 10mM pH 5 incubando por aproximadamente 5 minutos em gelo dando batidas na garrafa. Extratos enriquecidos em proteínas de membrana e de citosol foram obtidas de 1×10^7 CS usando o kit de extração de proteínas de membrana

(Calbiochem, Cat. #71772-3). As proteínas foram dosadas pelo método BCA (Thermo Scientific, USA). “Beads” de látex (Sigma) foram recobertos com PGLI (NR-19342, BEI Resources) ou PGLTB (NR-36510, BEI Resources). Um total de 1×10^8 “beads” recobertas foram incubadas com 500 mg de proteína de membrana ou de citosol de CS. Após três horas de incubação a temperatura ambiente, os “beads” foram separados por spin-down. Foram lavadas 2 vezes com PBS e centrifugação. Os ligantes foram digeridos em solução por 24hs. As amostras foram centrifugadas para separação dos beads.

As amostras foram identificadas como: PGLI-M (“Beads” PGLI + proteínas de membrana); PGLI-CITO (“Beads” PGLI + proteínas do citosol); PGLTB-M (“Beads” PGLTB + proteínas da membrana); PGLTB-CITO (“Beads” PGLTB + proteínas do citosol). Foram obtidas 3 replicatas biológicas de cada condição. Um total de 12 amostras foram corridas com três replicatas técnicas cada.

Os controles foram Controle-M (“Beads” + proteínas de membrana) e Controle-CITO (“Beads”+ proteínas de citosol). Foram corridas com três replicatas técnicas de cada controle.

4.17.2 Digestão em solução:

O processamento das amostras e a análise foi feita em colaboração com o Doutorando Andrés Rodrigues e Dra. Patrícia Cuervo do Laboratório de pesquisa em Leishmaniose-IOC-Fiocruz. Para espectrometria de massas “label free” ou sem marcação, a preparação da amostra é bastante simplificada e consiste nos procedimentos comumente usados e já padronizados, como a desnaturação das proteínas com agentes caotrópicos tais como ureia ou cloridrato de guanidina, redução de pontes dissulfeto com um reagente redutor, alquilação de resíduos livres de cisteína e digestão com tripsina ou uma protease alternativa (Morris, 2014).

Para a digestão foi realizado o seguinte protocolo. Dissolver até 100 microgramas de proteína em 40µL de TEAB 50mM e SDS 0,05%. Seguidamente reduzir com DTT. Colocar para isto 10ul de DTT 65mM para 40ul de solução. Incubar 30min a 60°C. Seguidamente colocar 1µL de iodoacetamida (IAA) 400mM para 50µL de solução. Incubar 15 minutos a T ambiente, protegido da luz. Para a digestão enzimática adicionar lisilendopeptidase (LEP) 1:100 a partir do LEP 20µg

que foi reconstituído em 100µL TEAB. (Colocar 5ul i.e, 1µg de LEP). Deixar digerir por 2 a 4hs. Adicionar 2µg de Tripsina (Promega, Madison, WI) com concentração 0,2ug/µL e deixar digerir “overnight”. A tripsina liofilizada é reconstituída colocando 100 µL de solução a 20 µg de tripsina. A solução é preparada com 30ul de buffer acético (da própria enzima) e 70µL de TEAB. Após a digestão, as amostras são tipicamente dessalinizadas em colunas ou ponteiras C18 para remover sais (Morris, 2014). Neste trabalho passamos as amostras pelo MicroSpinColumn (C18 Harvard Apparatus Cat#74-4601). As colunas se usam seguindo o seguinte protocolo. Para a ativação tratar com ACN (acetonitrila) 100% 3 vezes (usar 80µL para colunas Micro ou 100µL para colunas Macro). Centrifugar 3 min. a 3000 rpm. Tratar seguidamente com TFA (ácido trifluoroacético)1%, 4vezes (usar 80µL ou 100µL). Centrifugar 3 min. a 3000rpm. Em seguida passar as amostras duas vezes pelas colunas. Centrifugar 3 min. a 3000rpm cada vez. Lavar as colunas com TFA 0,1% umas 3 a 5 vezes. Centrifugar 3 min. a 3000rpm. Eluir os peptídeos com 50%ACN/0,1% TFA 2 vezes. (usar 30µL para MicroSpinColumn). Centrifugar 3 min. a 3000rpm. Repetir o processo com 70% ACN e depois com 80%. Em total resulta em eluato de 90µL. Os peptídeos obtidos são quantificados no Qubit com o kit Qubit protein Assay kit (Cat. #33211) (Thermo,USA). Antes de levar para o Orbitrap deve-se secar as amostras no SpeedVac.

4.17.3 Aquisição de dados por espectrometria de massas “label free”.

Comumente, experimentos “pull-down” seguidos de MS utiliza a LC-MS/MS. Nesta abordagem, é realizada uma separação dos peptídeos por cromatografia líquida em coluna de fase reserva com resina C18. Os nossos digestos peptídicos foram submetidos a análise por nanocromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (nLC-MS/MS). As amostras foram analisadas em triplicata biológica e triplicata técnica, na plataforma tecnológica de espectrometria de massas do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná (PDTIS-RPT02H). O sistema de nanocromatografia utilizado foi o Easy-nLC 1000 (ThermoFischer Scientific). Os peptídeos são eluídos com uma gradiente de solvente orgânico e direcionados à fonte de ionização “nano-electrospray” do espectrômetro de massas. Neste, os peptídeos foram carregados em uma coluna de fase reversa com comprimento de 30 cm e diâmetro interno de 75 µm empacotada “in-house” com fase estacionária

ReprosilPur C18 Acqua. O fracionamento dos peptídeos ocorreu com um fluxo de 250 nL/min, ao longo de um gradiente cromatográfico contínuo de duração de 125 minutos. O gradiente aplicado foi de 5 a 60% da solução da fase móvel B para peptídeos do extrato de membrana e de 5 a 40% para peptídeos de extrato de citosol (extrato mais hidrofílico). A composição da fase móvel foi 5% de DMSO e, 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila), com duração de 125 minutos.

Em seguida os peptídeos passam aos analisadores de massas e são selecionados para fragmentação através de uma aquisição dependente de dados (DDA: *Data-Dependent Acquisition*). Para isto sistemas de alta-resolução e alta acurácia de massa (e.g., sistemas equipados com analisadores de massa tipo Orbitrap ou Tempo de vó) são usados com frequência. Os espectros neste trabalho foram adquiridos no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL-ETD (Thermo Fischer Scientific) em modo DDA, alternando automaticamente entre a aquisição do “full scan” MS e MS/MS, com uma exclusão dinâmica de 90 segundos. A exclusão dinâmica se refere a seleção dos precursores para o MS/MS. A varredura inicial do MS (m/z 300-2000) foi feita com uma resolução de 60.000. Para cada espectro MS, os 10 íons mais intensos com carga superior a 2+ foram isolados, um de cada vez, e fragmentados pela técnica CID (“Collision Induced Dissociation”).

4.17.4 Processamento dos dados de espectrometria de massas.

Uma vez que os dados brutos foram adquiridos, eles devem ser processados. Os primeiros passos de processamento incluem: filtrar o ruído, subtrair o background, deconvolução isotópica e de carga, detecção de pico, calibração da massa e alinhamento do tempo de retenção. Para a identificação dos nossos dados, os arquivos .RAW foram analisados pela estratégia de PSM (“Peptide-Spectrum Match”) usando o programa “Comet PSM” da plataforma PatternLab 4.0.0.13 (90,91) e uma base de dados contendo 150184 seqüências de proteínas da espécie *Homo sapiens*, obtidas do banco UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>) em agosto de 2015. Recomenda-se que os dados brutos de MS sejam analisados com uma base de dados que inclua uma base de dados denominada ‘decoy’ (92). A base de dados ‘decoy’ é gerada criando sequências randomizadas ou reversas de seqüências de amino ácidos da base de dados original. “Decoy hits” podem ser utilizados para estimar a taxa de falsos positivos (false-positive rate também chamado false

discovery rate, FDR) de identificações de peptídeos e proteínas, e pode ser utilizado para selecionar um “score cutoff” ou valor de corte que resultem num valor aceitável de falso positivo. Geralmente, uma taxa de falsos positivos de até 1% é aceita (i.e., < ou = 1 proteína “decoy” ID em uma lista de 100 *hits* de proteínas) (92). Durante as nossas buscas foi estimada a taxa de identificação de falsos positivos (FDR) de 1% ao nível de proteína, usando uma base de dados “target-decoy reverse”. Esse banco de dados é composto pelas mesmas seqüências de humano (seqüências alvo), assim como seqüências que correspondem ao reverso das seqüências alvo (“Target-Reverse”) e também as seqüências de proteínas contaminantes comuns (“include common contaminants in the Targets”) disponíveis no “PatternLab’s Generate Search DB” da plataforma PatternLab. Os parâmetros de busca consistiram em aceitar peptídeos com até 3 “clivagens perdidas” por peptídeo, contendo carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa, oxidação de metionina como modificação variável e até 40 ppm de tolerância de massa para o íon precursor. Tolerância para o íon fragmentado (MS/MS): 1,0005 ppm. Os peptídeos identificados pelo Comet foram avaliados usando a ferramenta SearchEngine Processor (SEPro), também da plataforma PatternLab. As identificações foram agrupadas pela carga do peptídeo (+2, +3 ou mais) e depois por estado triptico (totalmente triptico ou semi-triptico). Adicionalmente, foi estabelecido um valor de 6 resíduos como comprimento mínimo dos peptídeos identificados. Os resultados foram posteriormente processados para aceitar só seqüências com menos do que 5 ppm de variação ao nível de peptídeo e 2 ou mais evidências independentes (por exemplo: dois ou mais peptídeos diferentes para a mesma proteína, e/ou identificação de um peptídeo com diferente estado de carga e/ou versão do mesmo peptídeo modificado e não modificado). As proteínas que passaram os critérios e filtros de validação do SEPro, foram consideradas identificadas. Posteriormente a lista de identificações foi filtrada manualmente para eliminar as identificações redundantes ou as identificações com contagem espectral de 1 ou os contaminantes. Dados de diferentes corridas de MS (ou replicatas) sempre contêm viés inerente e variações, resultando em sinais com mudanças sistemáticas ou por acaso. Portanto, normalizar as corridas e quantificar adequadamente permite ao usuário comparar corridas diferentes. A reprodutibilidade alta e alinhamento

cuidadoso de picos cromatográficos são fatores críticos para a quantificação pelo método “label free”.

Os dados obtidos para cada proteína incluíram número de peptídeos únicos, “spectral counts” (contagem espectral) e intensidades de MS1. A quantificação pode ser realizada por contagem espectral ou pelo método XIC (“Extracted Ion Chromatogram”). Em LC-MS, um íon com um m/z em particular é detectado e registrado com uma determinada intensidade, num determinado momento. A intensidade de sinal da ionização por elétron spray (ESI) correlaciona com a concentração do íon. A quantificação relativa dos nossos dados foi feita usando o programa SEPro, módulo “XIC Analysis” da plataforma PatternLab que obtém os “XICs” a partir dos MS1 deconvoluídos. Os parâmetros escolhidos para a quantificação foram: Cargas aceitas +2, +3, XIC ppm de 8. Os XIC não foram normalizados. Após esta análise usamos o módulo chamado Búzios para obter uma representação gráfica da distribuição das replicatas técnicas e biológicas dos grupos comparados e avaliar a semelhança entre os dados inseridos. No nosso caso observamos um agrupamento dados das replicatas para PGLI-membrana e outro agrupamento dos dados das replicatas de PGLTB-membrana. Este módulo serve como um controle de qualidade visual. Para as proteínas comuns de PGLI e PGLTB em duas ou mais replicatas biológicas, usamos o módulo “TFold” do PatternLab para detectar proteínas diferencialmente expressas. Os parâmetros de seleção utilizados foram “BH q value”: 0,05 e “F-Stringency: 0,100. Os resultados são representados como um gráfico de Fold change vs Probabilidade. Para a comparação relativa dos ligantes de PGLI e PGLTB foram aceitas as proteínas diferencialmente expressas com Fold change ≥ 1.5 e $p \leq 0.05$.

4.17.5 Análise de bioinformática

O programa String v.10.0 (<http://string-db.org/>) foi utilizado para prever as interações proteína-proteína e também para agrupar de acordo à função. String v. 10.0 utiliza bases de dados de interação física de proteínas e bases de dados de vias biológicas curadas (MINT, HPRD, BIND, DIP, BioGRID, KEGG, Reactome, IntAct, EcoCyc, NCI-Nature Pathway Interaction Database, GO). Alternativamente, o programa IIS–Integrated Interactome System (93) foi utilizado.

RESULTADOS

5.1 PGLI participa da adesão e internalização de *M. leprae* em células de Schwann humanas da linhagem ST8814.

Para investigar o papel do PGLI na adesão e internalização do *M. leprae* na célula hospedeira, CS foram estimuladas com *M. leprae* morto por irradiação γ (MLirr), ou infectadas com BCG selvagem (BCGWT), BCGPGLI e BCGPGLTB previamente marcados com o fluoróforo verde PKH67. Em seguida, as culturas foram incubadas a 4°C ou 33°C nos tempos de 4 e 48h. Após o período de incubação, a fluorescência foi analisada por citometria de fluxo e o grau de adesão, associação (adesão + internalização) e internalização bacteriana à célula foi quantificado. Nestes ensaios adicionamos azul de Tripán antes da leitura no citômetro de fluxo para o “quenching” das bactérias extracelulares. Desta maneira pudemos quantificar o percentual de internalização e subtraí-lo do percentual de associação para medirmos o grau de adesão. Os experimentos realizados a 4°C/4h tiveram como objetivo inibir a internalização e, assim, avaliar melhor o efeito do PGLI sobre a adesão bacteriana. Como controle, foi incluído em todos os ensaios MLirr. Os resultados mostram que a expressão do glicolípido PGLI no BCG, aumenta a capacidade da bactéria de aderir à CS (Figura 10 A-B). e a capacidade da bactéria de internalizar em CS (Figura 10 C-D).

Estes dados foram corroborados através de microscopia de fluorescência, onde se observou um maior número de bacilos fluorescentes nas células infectadas com BCGPGLI. Estes resultados foram quantificados e apresentados na tabela 3.

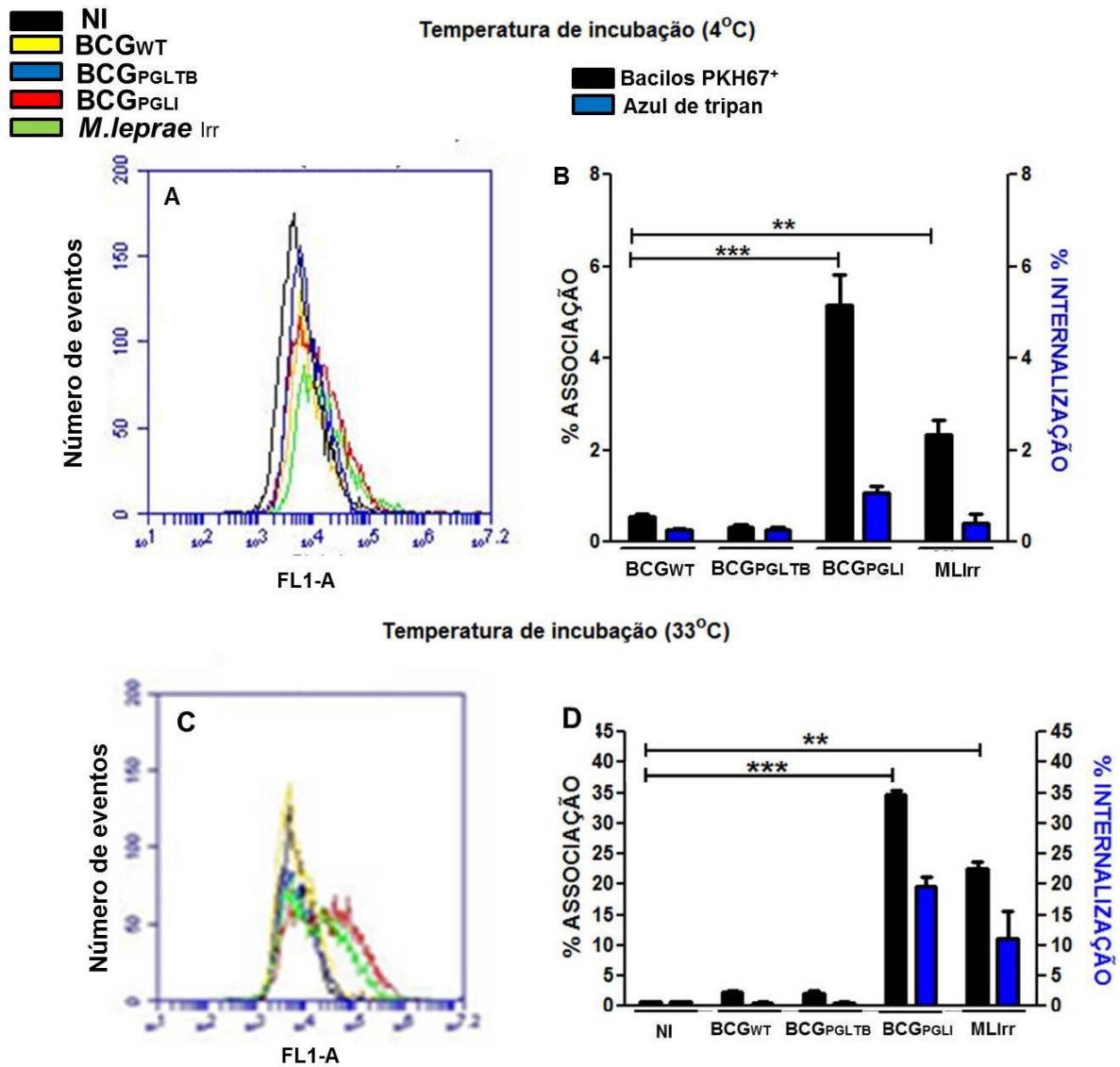


Figura 10. PGLI promove a adesão e internalização do BCGWT em células de Schwann da linhagem ST8814. Células estimuladas com *M.leprae* morto (MLirr) ou infectadas com BCGWT, BCGPGLI, BCGPGLTB previamente marcados com o fluoróforo verde, PKH67, na MOI 50:1, foram incubadas à 4°C (A-B) ou 33°C (C-D) por 4 horas. (A, C) Histogramas representativos mostrando o deslocamento da fluorescência emitida pelas células que internalizaram os bacilos marcados com PKH67 analisada através do canal FL1-A. (B, D) A porcentagem de células com bacilos associados (barras pretas) ou internalizados (barras azuis) foi quantificada. A diferença entre a barra preta e azul é a adição ou não de azul de tripan que permite o “quenching” da fluorescência das bactérias extracelulares. Os valores são médias ± SEM de 3 experimentos independentes. A significância das diferenças entre BCGWT e BCGPGLI ou *M.leprae* foi avaliada: **, p<0.01; ***, p<0.001. Análise estatística usando ANOVA.

Tabela 3: Quantificação do grau de adesão e associação das cepas de micobactérias à CS avaliado por microscopia de fluorescência.

Cepas bacterianas	Condição analisada			
	Temperatura de incubação (°C) / Tempo de incubação(h)			
	Adesão 4°C/4h		Associação 33°C/4h	
	% Células Positivas *	N° bacilos/200 cels **	% Células Positivas *	N° bacilos/200 cel **
BCGWT	4 ± 2,48	8 ± 3,80	6 ± 2,35	12 ± 1,30
BCGPGLTB	3 ± 1,83	8 ± 3,03	6 ± 1,30	10 ± 2,97
BCGPGLI	9 ± 2,84*	19 ± 1,92*	25 ± 3,42**	96 ± 5,73***
ML irr	7 ± 2,79*	12 ± 2,58*	18 ± 2,07*	72 ± 7,50**

*Número de células de Schwann ST8814 com bacilos associados. **Número de bacilos por célula. As cepas de BCG e *M.leprae* foram marcadas com PKH67 e a MOI utilizada foi de 50:1. Os valores são médias ± SEM de 3 experimentos independentes. A significância das diferenças entre BCGWT e BCGPGLI ou *M. leprae* foi avaliada: *p<0,05 ; **p<0,01; ***p<0,001. Análise estatística usando ANOVA.

No tempo de 48 horas de incubação à 33°C o impacto do PGLI sobre a internalização e associação do BCG pode ser melhor evidenciado (Figura 11). Após 48 h de incubação observamos que 90% dos bacilos BCGPGLI associados estão internalizados.

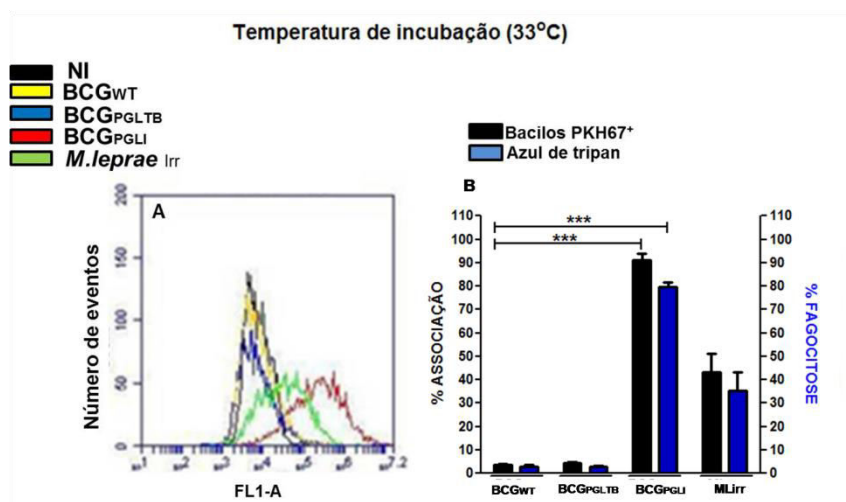


Figura 11. PGLI promove a internalização do BCG em células de Schwann da linhagem ST8814. O grau de internalização foi determinado por citometria de fluxo, após incubação das células com as bactérias numa MOI de 50:1 por 48 h a 33°C. A) Histograma representativo mostrando o deslocamento da fluorescência emitida pelas células que internalizaram os bacilos marcados com PKH67 analisada através do canal FL1-A. B) A porcentagem de células com bacilos associados (barras pretas) ou internalizados (barras azuis) foi quantificada. A diferença entre a barra preta e azul é a adição ou não de azul de tripan que permite o “quenching” da fluorescência das bactérias extracelulares. Os valores são médias ± SEM de 3 experimentos independentes. A significância das diferenças entre BCGWT e BCGPGLI ou *M. leprae* foi avaliada: ***, p<0.001. Análise estatística usando ANOVA.

Os resultados indicam que o BCGWT ou BCGPGLTB apresentam uma capacidade reduzida de invadir a CS, ao passo que o BCG recombinante que expressa a molécula do PGLI é altamente fagocitado pela CS.

5.2 A associação de BCG_{PGLI} à CS é um fenômeno dependente do tempo e da viabilidade dos bacilos

Ainda no contexto de fagocitose avaliamos por citometria de fluxo o efeito do tempo de incubação na associação de diferentes cepas de BCG recombinantes à CS e o grau de internalização. O resultado reforça o fato que apenas o BCG_{PGLI} é fagocitado e mostra que este é um fenômeno dependente do tempo. Além disto, evidenciamos realmente o tempo de 48h de infecção se mostra mais eficiente para a associação bacteriana (Figura 12).

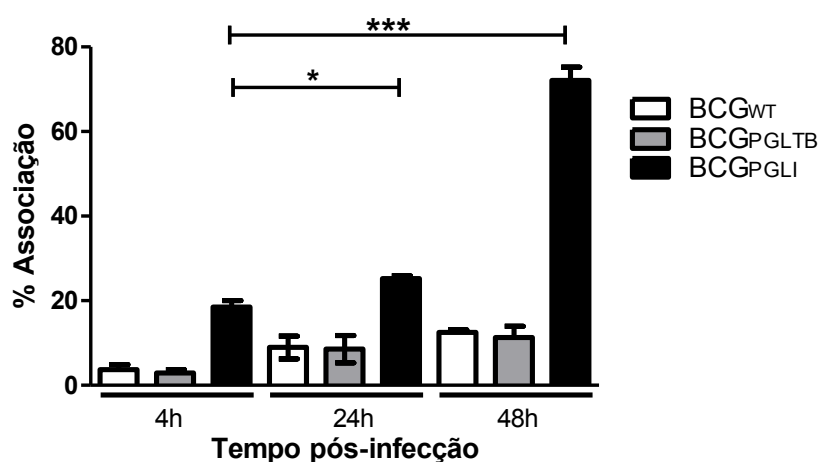


Figura 12. Associação de BCG_{PGLI} às células de Schwann ST8814 é tempo dependente. Curva temporal de associação das cepas de BCG recombinantes com CS-ST8814 a 33°C usando uma MOI 50:1. A porcentagem de células que internalizaram bacilos marcados com PKH67 foi determinada por citometria de fluxo no canal FL1-A. Os valores são médias \pm SEM de 3 experimentos independentes. Análise estatística usando ANOVA * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Para avaliarmos se a viabilidade do bacilo interferia na sua fagocitose pelas CS, irradiamos as diferentes cepas de BCG com uma dose letal de radiação γ . Os resultados obtidos por citometria de fluxo foram analisados através da quantificação do número de células com bacilo internalizado (Figura 13 A, Figura 14 A) e pela intensidade média de fluorescência (MIF) emitida por estas células infectadas (Figura 13 B, Figura 14 B). Estes resultados mostram que apesar do BCG_{PGLI} morto ser internalizado, a viabilidade bacilar é importante neste processo, uma vez que foi observada uma redução do percentual de células com bactérias

internalizadas. Esta redução corresponde a aproximadamente 50% quando comparada com as células tratadas com bacilos viáveis (Figura 13A, Figura 14A). Pelo MIF observamos que o número de bacilos por célula é maior quando os bacilos são viáveis (Figura 13 B).

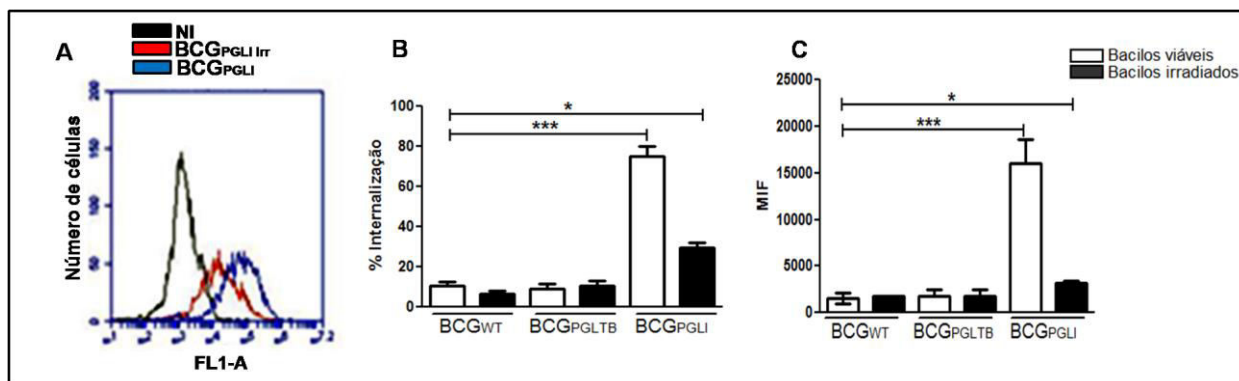


Figura 13. BCGPGLI vivo é mais internalizado por células de Schwann quando comparado com o morto. O grau de fagocitose de bacilos vivos e mortos foi determinado por Citometria de Fluxo. A, B) O histograma representativo mostra a leitura da fluorescência de PKH67 (FL-1) que foi representada como percentual de internalização de BCGWT, BCGPGLTB e BCGPGLI vivos e mortos em CS-ST8814 após 48hs de incubação a 33°C, MOI 50:1. C) Intensidade de fluorescência média (MIF) de BCGWT, BCGPGLTB e BCGPGLI vivos e mortos em CS-ST8814 após 48hs de incubação a 33°C. Os valores são médias \pm SEM de 3 experimentos independentes. A significância das diferenças entre BCGWT e BCGPGLI ou BCGPGLTB foi avaliada: *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$. Análise estatística usando ANOVA.

Resultados semelhantes foram observados com *M.leprae*. Observamos também que este fenômeno é dependente da MOI utilizada (Figura 14 A-B). Usando MOI de 100:1 observamos que o porcentual de células com bactérias internalizadas é semelhante para a condição de bacilos viáveis e mortos. No entanto, o MIF mostra que existe maior número de bacilos por célula na condição de bacilos viáveis.

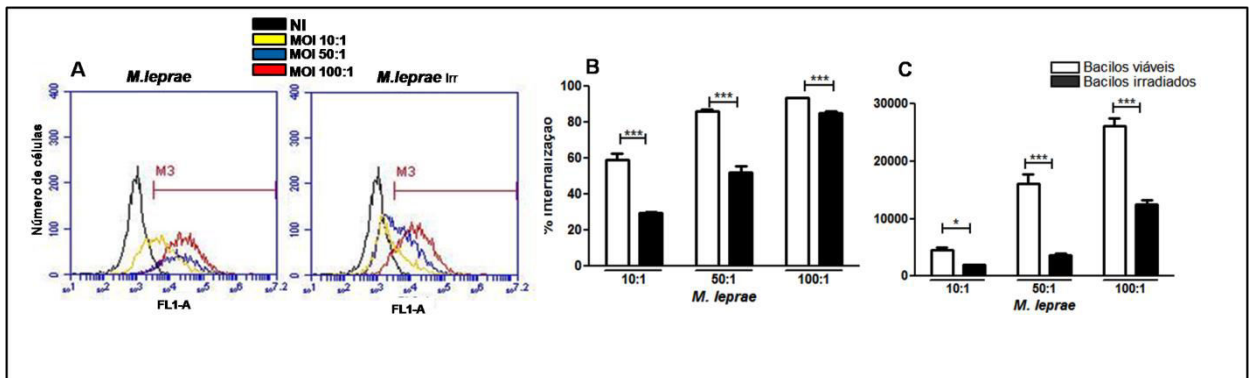


Figura 14. *M. leprae* vivo é mais internalizado por células de Schwann quando comparado com o morto. O grau de fagocitose de bacilos vivos e mortos foi determinado por citometria de fluxo. A, B) Os histogramas representativos mostram as leituras da fluorescência de PKH67 (FL1) que foram representadas como percentual de internalização de *M. leprae* vivos (barras brancas) e mortos (barras pretas) em CS-ST8814 após 48hs de incubação a 33°C, MOI (10:1), (50:1), (100:1). C) Intensidade de fluorescência média (MIF) de *M. leprae* vivos e mortos em CS-ST8814 após 48hs de incubação a 33°C. Os valores são médias \pm SEM de 3 experimentos independentes. A significância das diferenças entre BCGWT e BCGPLI ou BCGPLTB foi avaliada: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Análise estatística usando ANOVA.

A importância da viabilidade bacteriana na associação às CS foi confirmada por microscopia de fluorescência (Figura 15 A e B). Neste ensaio, bacilos viáveis e irradiados foram corados com PKH 67 (fluórofo verde) e em seguida incubados com CS por 48h. A imagem mostra o maior grau de associação de BCG_{PLI} à CS quando comparado ao BCG_{WT} e BCG_{PLTB}. Ainda mostra que o bacilo vivo tem maior capacidade de associação à CS que o morto. A contagem dos bacilos associados usando microscopia de fluorescência concorda com os achados de citometria de fluxo (Figura 15 A-B).

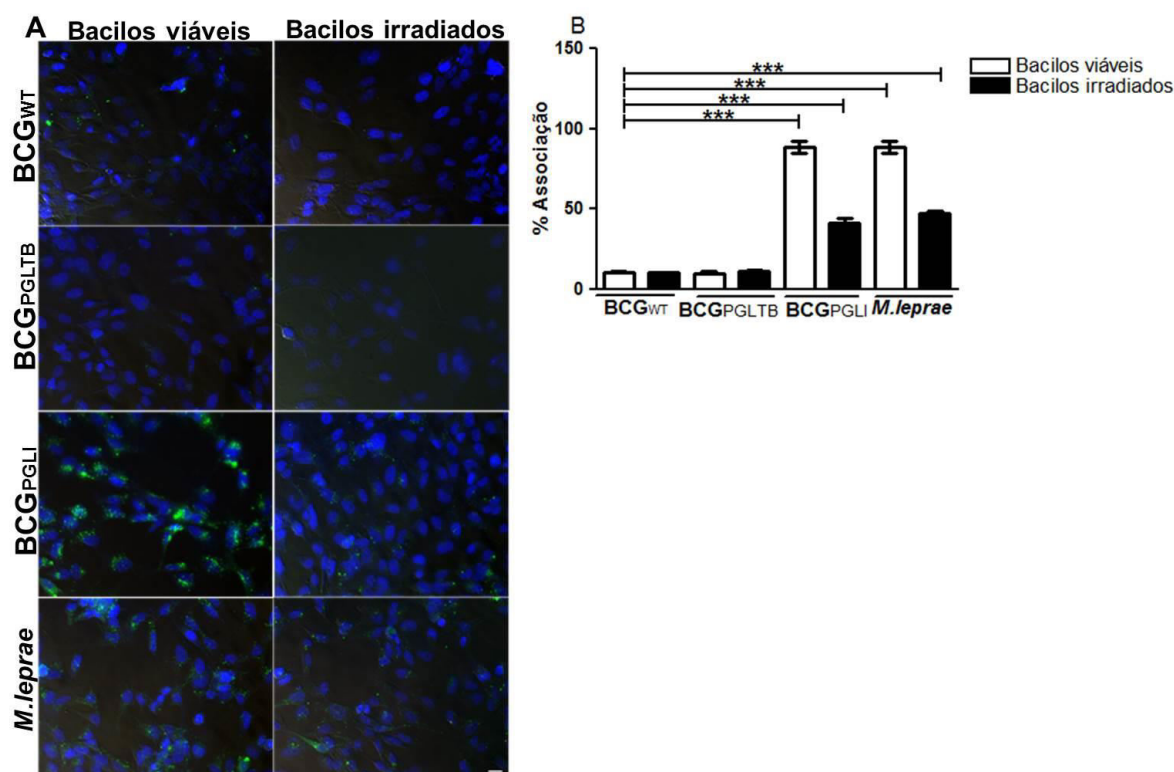


Figura 15. Associação de micobacterias vivas e mortas às células de Schwann ST8814. A) Microscopia de fluorescência do *M. leprae* e as cepas de BCG recombinantes marcados com PKH67 e incubados com CS-ST8814 por 48hs a 33°C e MOI 50:1. Os núcleos foram marcados com DAPI. Escala 10µM. B) O gráfico representa a porcentagem de células com bacilos associados; média de 200 campos. Os valores são médias ± SEM de 3 experimentos independentes. A significância das diferenças entre BCG_{WT} e BCG_{PGLI} ou BCG_{PGLTB} foi avaliada: *, p<0.05 ;**, p<0.01; ***, p<0.001. Análise estatística usando ANOVA.

5.3 Mapeamento da porção da molécula do PGLI responsável pela interação com a célula de Schwann.

Para mapearmos a porção da molécula do PGLI responsável pela interação com a CS, “beads” de látex foram recobertos com o glicolípido PGLI ou com ND-o-BSA. ND-o-BSA é um derivado sintético do PGLI que carece da porção lipídica. Este derivado possui a porção dissacarídica da extremidade não redutora do PGLI conjugado ao fenol e este ligado ao BSA. Antes de realizarmos os experimentos de interação propriamente ditos, verificamos a ligação do PGLI e ND- o -BSA aos beads de látex. O anticorpo monoclonal CS48 (BEI Resources, NR-19370) reconhece a porção sacarídica da molécula de PGLI e da molécula de ND- o -BSA. Testamos a presença destas moléculas nos “beads” previamente incubados com as mesmas por citometria de fluxo, utilizando varias diluições deste anticorpo. A Figura 16 mostra que em todas as diluições testadas houve um deslocamento da fluorescência, tanto

nos “beads” recobertos com PGLI quanto com ND- o -BSA (Figura 16 B). A confirmação de que a cobertura dos “beads” foi eficiente foi confirmada também por microscopia de fluorescência (Figura 16 C).

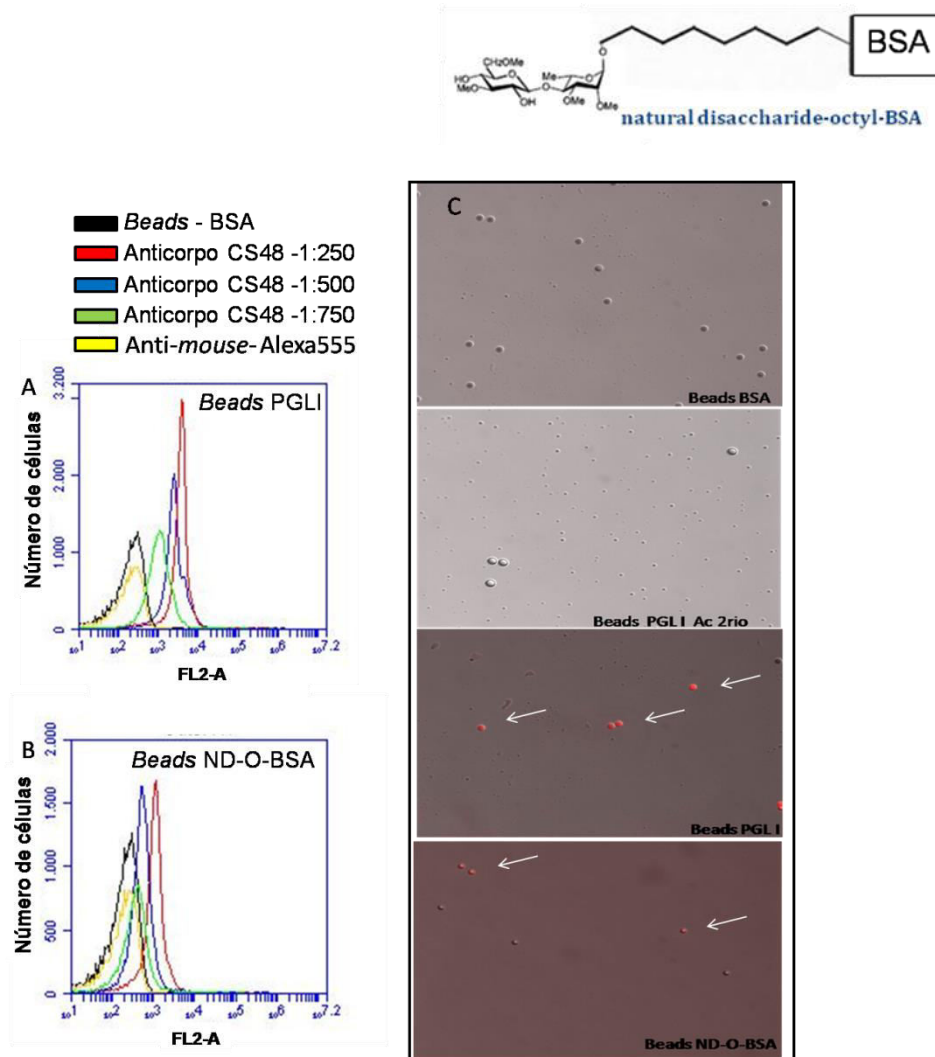


Figura 16. Preparação de “beads” de látex recobertos com PGLI e ND-o-BSA. Citometria de fluxo das partículas de látex, “beads”, recobertos com BSA; PGLI; ND-o-BSA. A estrutura do ND-o-BSA pode ser observada na figura acima dos histogramas. A-B) Os histogramas representam a fluorescência dos “beads” evidenciados no canal FL2 devido ao uso do anticorpo secundário conjugado a Alexa 555. O anticorpo (Ab) anti-PGLI foi testado em diferentes diluições, Ab 1/250; 1/500; 1/750. C) Os mesmos “beads” observados no microscópio de fluorescência.

Após a confirmação de que a metodologia utilizada para recobrir os “beads” com PGLI e ND-o-BSA foi eficiente, fomos avaliar a interação entre estes e as CS. Para isto, as SC ST8814 foram incubadas com “beads” verdes fluorescentes recobertos com BSA; PGLI ou ND-o-BSA e incubadas por 24h ou 48h nas proporções “beads”:célula de 10:1 ou 50:1. Foi determinado o grau de internalização por microscopia de campo claro e mediante citometria de fluxo, com leitura dos

“beads” fluorescentes internalizados no canal FL1. A Figura 17 mostra que a presença do PGLI ou ND-o-BSA favorece de maneira equivalente a internalização dos “beads” em CS da linhagem ST8814. Ou seja, o dissacarídeo terminal do PGLI parece ser a porção da molécula responsável pela atividade de adesão e internalização observada. Podemos ainda observar que o grau de internalização é dependente da dose e do tempo de interação. Vale a pena mencionar que, especialmente na proporção “beads”: célula de 50:1, observa-se uma internalização basal considerável dos “beads” controles (apenas revestidos com BSA).

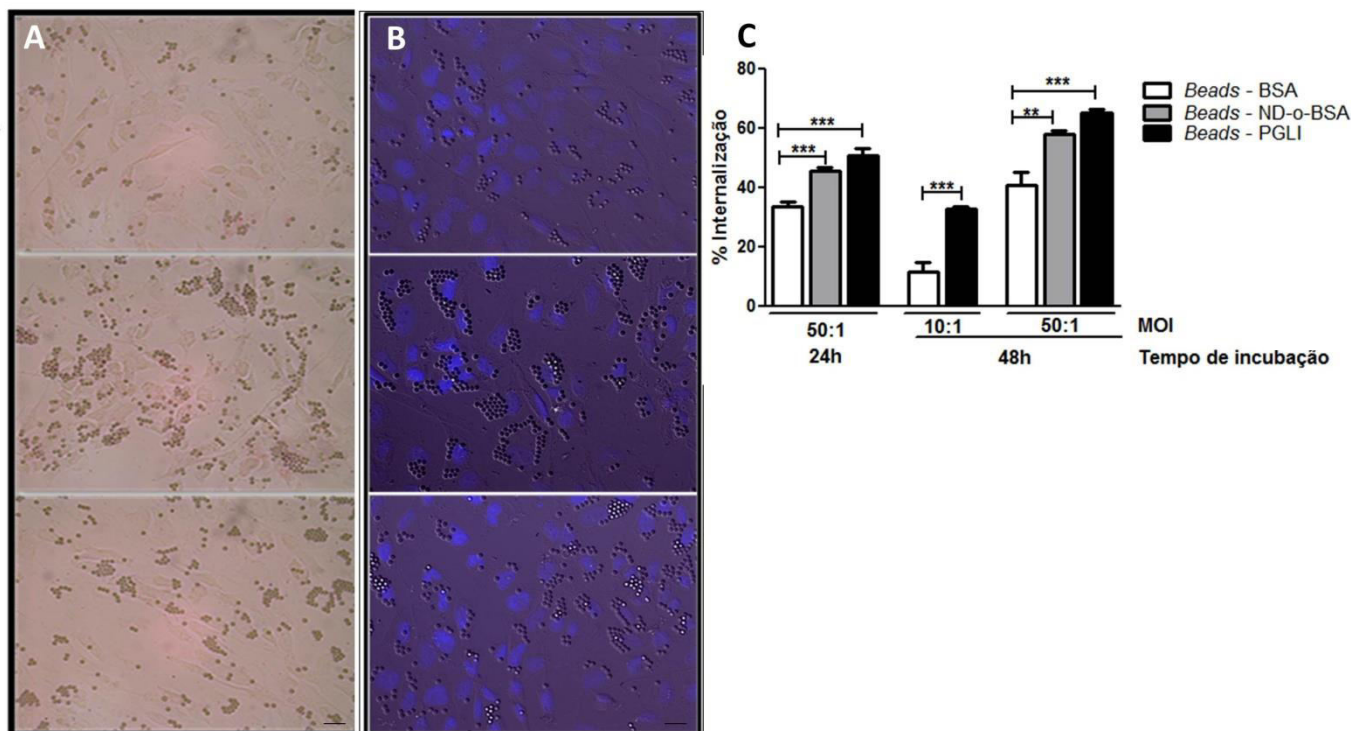


Figura 17. A porção dissacarídica correspondente à extremidade não redutora do trissacarídeo do PGLI mimetiza a capacidade da molécula inteira de interagir com as células de Schwann. Associação de “beads” de latex recobertos com BSA; PGLI ou ND-o-BSA a CS após incubação por 48hs a uma proporção de 50:1. A) visualização por microscopia de campo claro. B) visualização por microscopia de fluorescência. Núcleos foram marcados com DAPI. Barra, 10µM. C) Citometria de fluxo para determinar o grau de internalização de “beads” fluorescentes recobertos com BSA, PGLI ou ND-o-BSA por CS da linhagem ST8814. Os valores são médias ± SEM de 3 experimentos independentes. A significância das diferenças entre os “Beads” BSA e “Beads” PGLI ou “Beads” ND-o-BSA foi avaliada: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

5.4 Interação de *M. leprae*, das cepas de BCG recombinante, e dos “beads” de látex com células de Schwann primárias humanas.

Com o objetivo de tornarmos nossos resultados mais robustos, fomos avaliar se os resultados observados na linhagem ST8814 se reproduziam em CS primárias

humanas (PHSC). Para isso, as bactérias foram marcadas com PKH67 e, mediante o ensaio de “quenching” com azul de Tripán, já mencionado acima, foi determinada por citometria de fluxo a porcentagem de células com bactérias internalizadas. A Figura 18 mostra que os resultados obtidos com células primárias corroboram os obtidos com CS-ST8814. Observamos após 48h de incubação a 33°C na MOI 50:1 maior grau de internalização da cepa recombinante de BCG que expressa PGLI quando comparado com BCG_{WT} (Figura 18 A-B). O bacilo viável mostrou maior grau de interação que o morto, repetindo o resultado obtido com a linhagem. A internalização de “beads” fluorescente cobertos com PGLI foi também avaliada em PHSC. A Figura 18 C mostra que a presença de PGLI favorece a internalização de “beads” em PHSC.

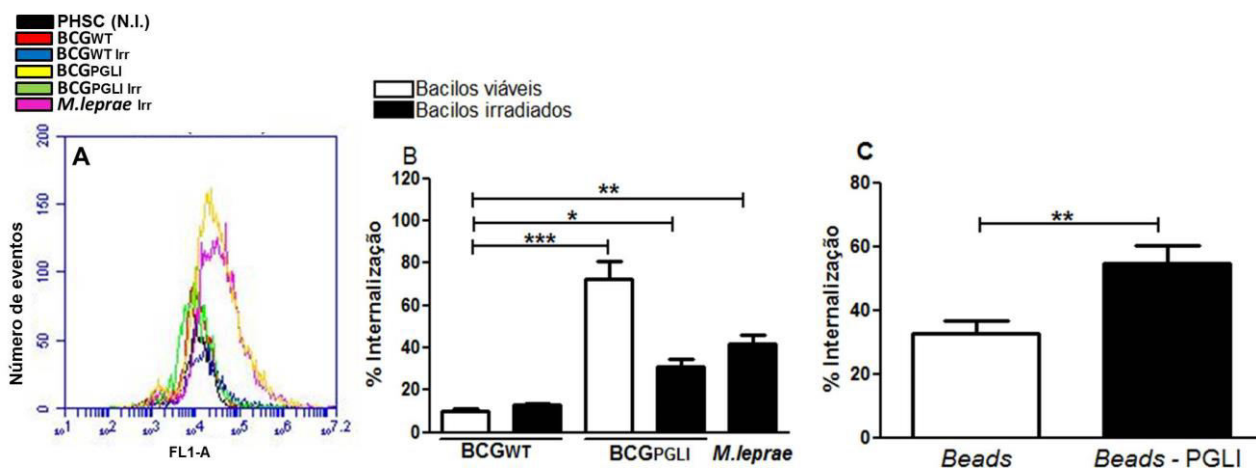


Figura 18. PGLI promove a internalização de BCG e beads de látex em células de Schwann primárias humanas. Citometria de fluxo para determinar a porcentagem de células com bactérias internalizadas após incubação de 48h a 33°C com as cepas recombinantes de BCG e *M.leprae* vivos e mortos a MOI 50:1. A) O histograma representa a fluorescência medida em FL1 das células com bactérias internalizadas que previamente foram marcadas com PKH67. B) A leitura foi representada como percentual de internalização de bacilos vivos (barras brancas) e mortos (barras pretas) em CS primárias C) Porcentagem de células com beads fluorescentes verdes recobertos com PGLI ou BSA internalizadas após incubação de 48h a 33°C com proporção 50:1 Os valores são médias \pm SEM de 3 experimentos independentes. A significância das diferenças foi avaliada: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Análise estatística usando ANOVA.

5.5 A pré-infecção com BCG_{PGLI} ou *M. leprae* favorece a internalização de BCG_{WT} em células de Schwann.

Um dado bastante interessante que nos chamou a atenção foi a eficiência maior de bactérias vivas de infectarem CS quando comparadas com os bacilos mortos. Como um possível mecanismo capaz de explicar este fenômeno, pensamos na possibilidade de que imediatamente após a infecção a bactéria modifique o repertório de receptores de fagocitose na célula hospedeira, proporcionando a entrada de novas bactérias por vias alternativas e, assim, favorecendo a infecção. Essa alteração do fenótipo funcional da célula hospedeira por uma primeira “onda” de infecção dependeria da viabilidade da bactéria, só as vivas sendo capazes de induzir tal alteração. Se isto de fato ocorresse, esperaríamos que bactérias com baixa capacidade de infectar a CS, como o BCG_{WT}, passassem a infectá-las com maior eficiência quando co-infectadas com *M. leprae*. Para testar esta hipótese, protocolos experimentais foram desenhados com duas “ondas” de infecção em sequencia, separadas por um intervalo de 1h. CS eram inicialmente infectadas por 1 hora com BCG_{PGLI} ou *M. leprae* vivos numa MOI de 10:1 (Figura 19 A). As células eram, então, reinfectedas numa segunda “onda” com BCG_{WT} por mais 48h. Somente as bactérias do segundo estímulo foram marcadas com PKH 67 e a internalização destas era avaliada por citometria de fluxo (Figura 19 B, C) e o grau de internalização das bactérias marcadas era determinado após “quenching” com azul de Tripan.

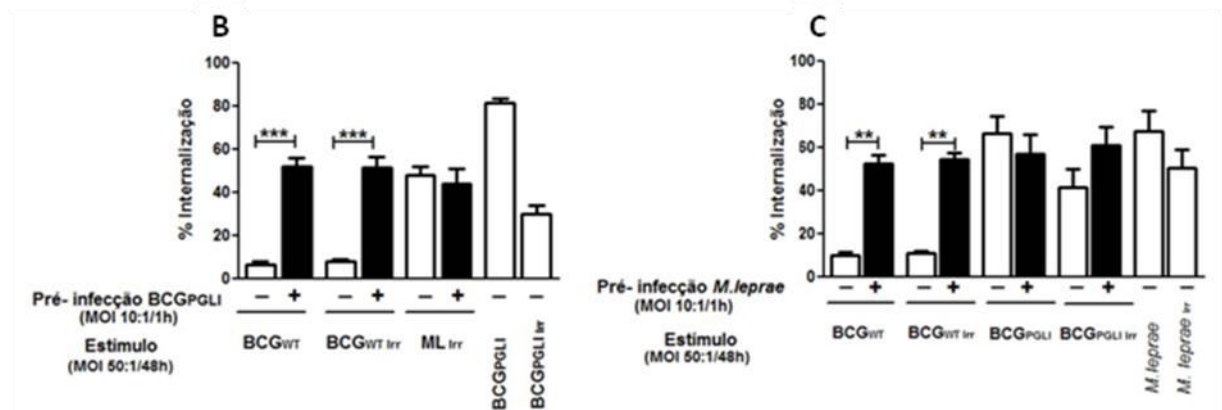
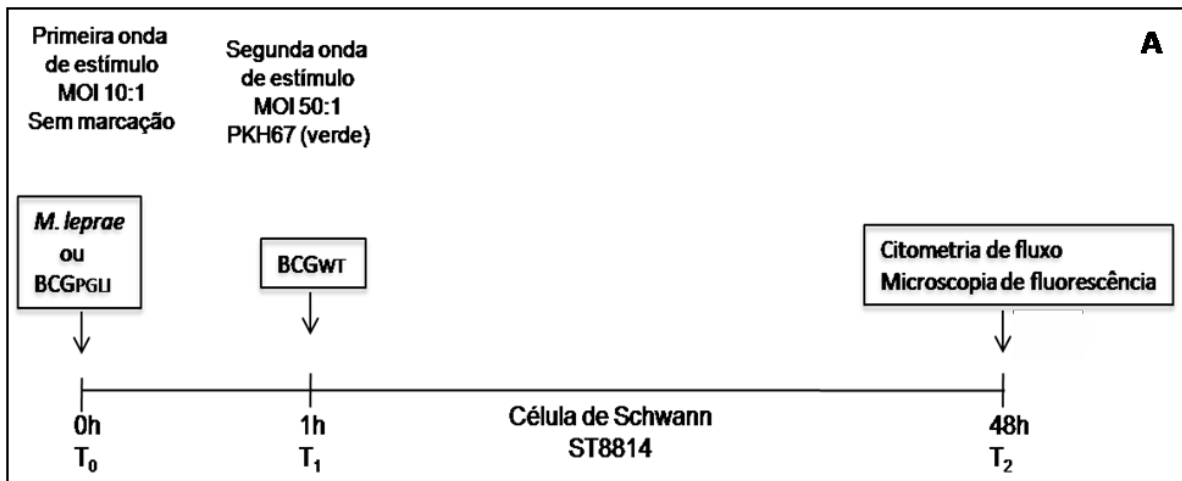


Figura 19. A pré-infecção com BCGPGLI ou *M. leprae* vivo aumenta a internalização de BCGWT em células de Schwann. Citometria de fluxo de CS-ST8814 co-infectadas. Uma primeira onda de estímulo (MOI 10:1) foi incubada por 1 hora antes de uma segunda onda por 48 h. A) Esquema mostrando o protocolo do experimento. B) BCGPGLI vivo foi usado na primeira onda de infecção. Em uma segunda onda foram colocados BCGWT, BCGWT irr ou ML irr. Como controle de internalização foi incluído BCGPGLI vivo e morto. C) *M. leprae* vivo foi usado como pré-estímulo. Em uma segunda onda foram colocados BCGWT, BCGWT irr, BCGPGLI, BCGPGLI irr. Como controle de internalização, foi incluído *M. leprae* vivo e morto. Os valores são médias \pm SEM de 3 experimentos independentes. A significância da diferença de bactérias associadas entre as culturas que receberam ou não uma pré-infecção foi avaliada: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

Observamos que com um primeiro estímulo com BCGPGLI ou *M. leprae* a cepa selvagem BCGWT, tanto viva como morta, passou a ser internalizada significativamente mais. Como esperado, este fenômeno foi dependente da viabilidade do bacilo do primeiro estímulo, isto é, tanto BCGPGLI ou *M. leprae* mortos por irradiação radiação γ não conseguiram aumentar a internalização do BCGWT (Figura 19 B e C).

Para confirmar estes resultados, realizamos ensaios onde o primeiro estímulo foi feito com “beads” de látex revestidos ou não com PGLI, na MOI de 5:1 e 10:1 comparando com BCGPGLI irradiado. Para a segunda infecção, todos os bacilos foram marcados com PKH67. O resultado foi analisado por citometria de fluxo (Figura 20 A-C). Os histogramas da Figura 20 A-C mostram que não houve deslocamento da fluorescência nas condições analisadas, sugerindo novamente que um pré-estímulo com bactéria viva é necessário. A quantificação da internalização está mostrada na Figura 20 D. Fizemos também como controle positivo a pré infecção com BCGPGLI vivo na MOI 10:1 e com *M.leprae* irradiado na mesma MOI e observamos novamente que apenas o BCGPGLI viável induziu a internalização do BCG selvagem nas CS (Figura 20).

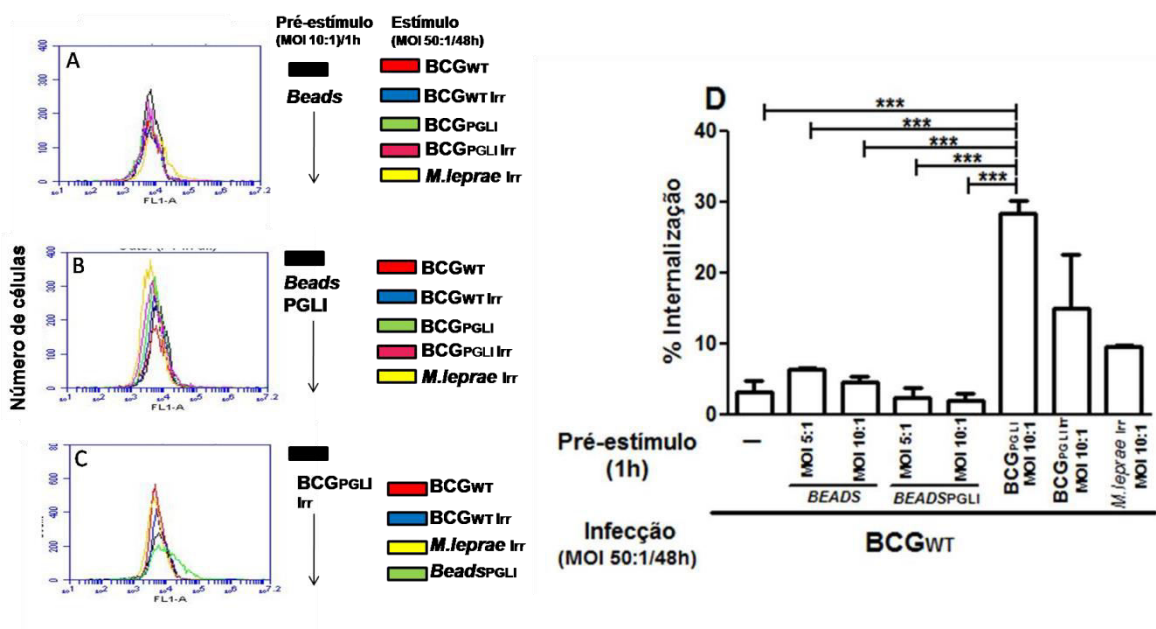


Figura 20. O pré-estímulo com “beads”, com “beads” PGLI ou BCGPGLI irr não aumenta o grau de internalização de BCGWT em células de Schwann. Citometria de fluxo de células de Schwann ST8814 co-infectadas. Uma primeira onda de estímulo foi incubada 1 hora antes da segunda onda. Foram usados como pré-estímulos A) “beads”, B) “beads” PGLI e C) BCGPGLI irr (MOI10:1). Em uma segunda onda foram colocados BCGWT, BCGWT irr, BCGPGLI irr, BCGPGLI irr e ML irr (50:1) marcados com PKH67 ou beads PGLI fluorescentes. Como controle de internalização, foram incluídos BCGWT, BCGPGLI vivo ou morto e MLirr. Os histogramas representativos mostram a fluorescência de PKH67 (FL1). D) O grau de internalização de BCGWT foi representado no gráfico. Nem o pré-estímulo com partículas de látex (beads ou beads PGLI) nem bacilos mortos (ML irr ou BCGPGLI irr) aumentou o grau de internalização de BCGWT. Os valores são médias ± SEM de 3 experimentos independentes.

Numa serie seguinte de experimentos pré-estimulamos as células com os bacilos viáveis ou irradiados e como segunda “onda” utilizamos “beads” de latex

fluorescentes verdes. Observamos que os bacilos vivos não são capazes de aumentar o grau de internalização de partículas inertes. Lembrando que as partículas de látex per sé são internalizadas pela CS. Este resultado sugere que as bactérias vivas expressando PGLI induzem uma mudança fenotípica na célula hospedeira para um perfil que propicia seletivamente a entrada de BCGWT ou algum componente micobacteriano, descartando a possibilidade de tratar-se de um aumento de atividade fagocítica inespecífica (Figura 21).

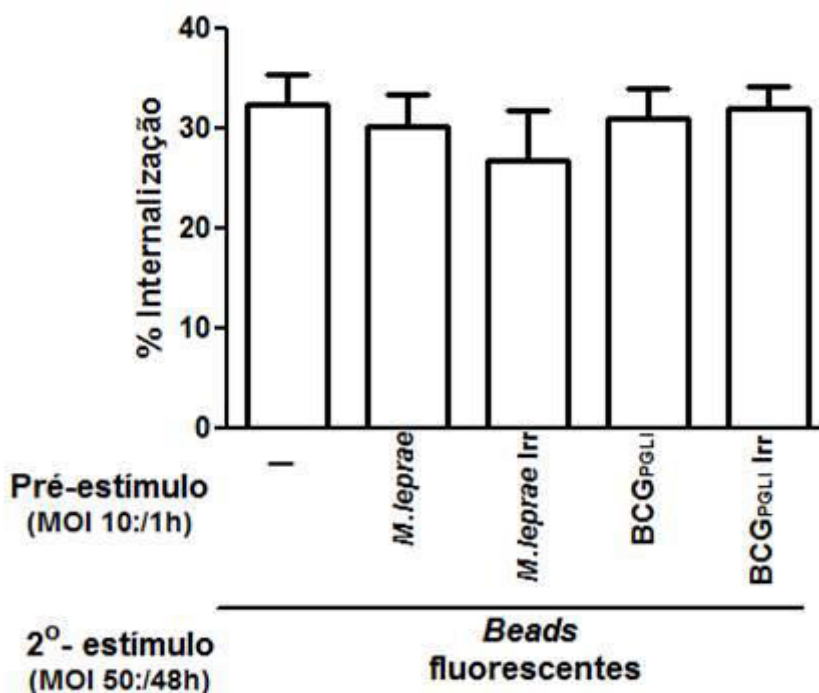


Figura 21. O pré-estímulo com micobacterias expressando PGLI não aumenta a atividade fagocítica da CS de forma inespecífica. Resultado de citometria de fluxo mostrando que após o pré-estímulo com BCG^{PGLI} ou *M. leprae* vivo (MOI 10:1) não existe aumento de internalização de “beads” verdes fluorescentes (relação “beads”: célula 50:1) após 48h de incubação a 33°C e. Os valores são médias ± SEM de 3 experimentos independentes.

As CS não são capazes de fagocitar algumas micobactérias, como por exemplo, o *M. smegmatis* (53). Portanto, o passo seguinte foi avaliar se estes pré-estímulos poderiam fazer com que as CS pudessem agora internalizar este bacilo. Observamos que a pré-estimulação das CS com *M. leprae* viável não foi capaz de levar à internalização do *M. smegmatis*, sugerindo que a primeira “onda de infecção” pode estar modulando a expressão de receptores que reconhecem componentes presentes na superfície do BCGWT e não no *M. smegmatis* (Figura 21).

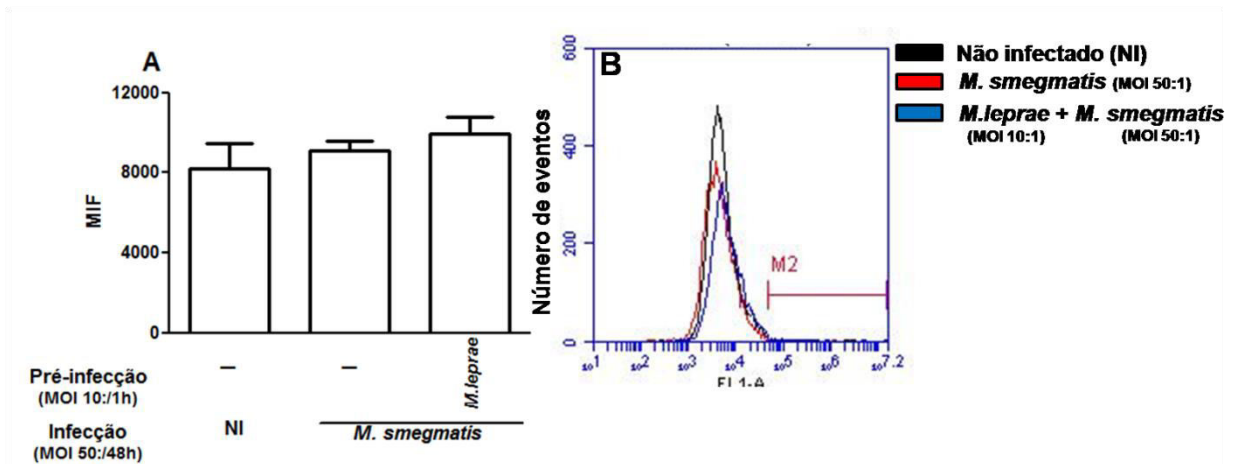


Figura 22. O pré-estímulo com *M. leprae* não favorece a entrada de *M. smegmatis* em CS. A) Citometria de fluxo mostrando que após o pre-estímulo com *M. leprae* (MOI 10:1) não ocorre aumento de internalização de *M. smegmatis* (MOI 50:1) marcado com PKH67 após 48h de incubação a 33°C. B) O histograma representativo mostra a fluorescência de PKH67 (FL1). Os valores são médias \pm SEM de 3 experimentos independentes.

O passo seguinte foi tentar identificar os receptores que a infecção com BCGPGLI ou com o *M. leprae* vivo estaria modulando na CS e que explicaria a maior internalização do BCG selvagem. Um fato já descrito na literatura é que os resíduos de manose que constituem as extremidades não redutoras das moléculas de ManLAM presentes na sua superfície são muito importantes para o reconhecimento e a resposta imune contra *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. bovis* BCG. Somado a isto, é sabido que *M. smegmatis* expressa na sua parede celular não Man-LAM, mas Pi-LAM, ou seja moléculas de LAM que apresentam como resíduo terminal não redutor fofaditil-mio-inositol e não manose (70). Como esta molécula não é reconhecida pelo receptor de manose (CD206), exploramos a possibilidade de receptores de lectina tipo C estarem envolvidos na endocitose de micobactérias nas CS pré-estimuladas com micobactérias vivas expressando PGLI.

Através de citometria de fluxo avaliamos, então, a internalização de BCGWT marcado com PKH67 por CS, num ensaio de competição colocando manose em excesso no meio de cultura. A Figura 23 mostra que a presença de manose a 100 μ g/mL ou 1000 μ g/mL reduziu de forma significativa o grau de internalização da segunda “onda” de infecção com BCGWT induzido pelo pre-estímulo com *M. leprae* ou BCGPGLI. Na condição de 1000 μ g/mL de manose, a redução da internalização de BCGWT foi de 43% e 37% na presença de BCGPGLI ou *M. leprae*,

respectivamente. Estas observações foram corroboradas por microscopia de fluorescência (dados não mostrados) e sugerem o reconhecimento de resíduos de manose no processo de fagocitose do BCGWT.

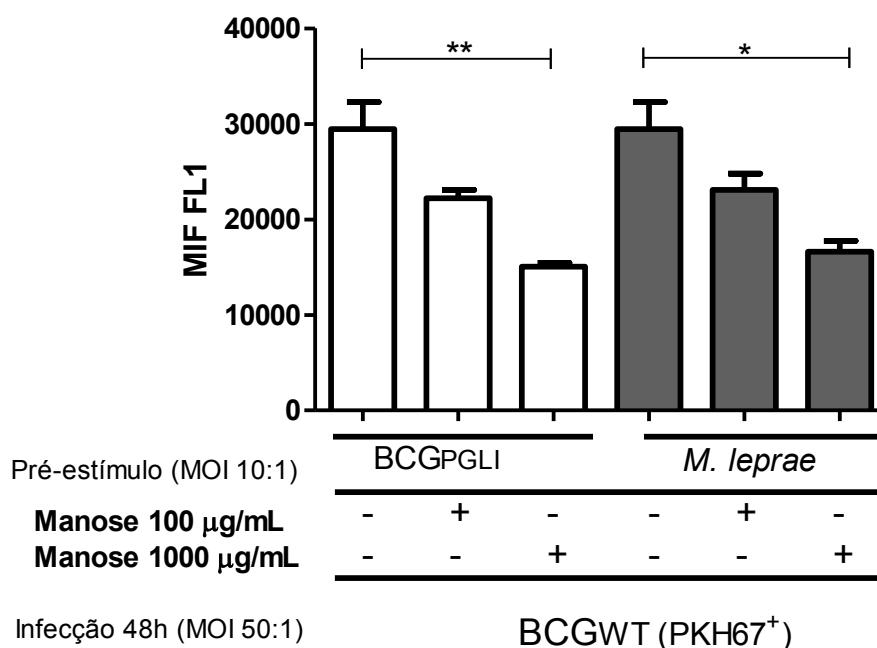


Figura 23. Manose inibe a internalização de BCGWT em CS pré-tratadas com BCGPGLI ou *M. leprae* vivos. Citometria de fluxo de CS- ST8814 co-infectadas. Após o pre-estímulo com *M. leprae* ou BCGPGLI vivo (MOI de 10:1) por 1 h, a adição de manose a 100 ou 1000µg/mL reduz a internalização de BCGWT (MOI de 50:1) marcado com PKH 67 após 48h de incubação. Os valores são médias ± SEM de 3 experimentos independentes.

Avançando ainda mais na nossa hipótese, “beads” de latex fluorescentes foram recobertas com Man-LAM de *M. leprae* (Bei Resources NR-19348). As CS foram pré-estimuladas conforme mencionado anteriormente, com bacilos viáveis ou irradiados por uma hora. Após este tempo foi feita o segundo estímulo. Neste, variamos o tempo de incubação (24 e 48h) e a proporção de “beads”:célula. Os resultados mostram que o pré-estímulo com BCG PGLI ou *M. leprae* vivo aumenta significativamente o grau de internalização de “beads” cobertos de LAM (Figura 24).

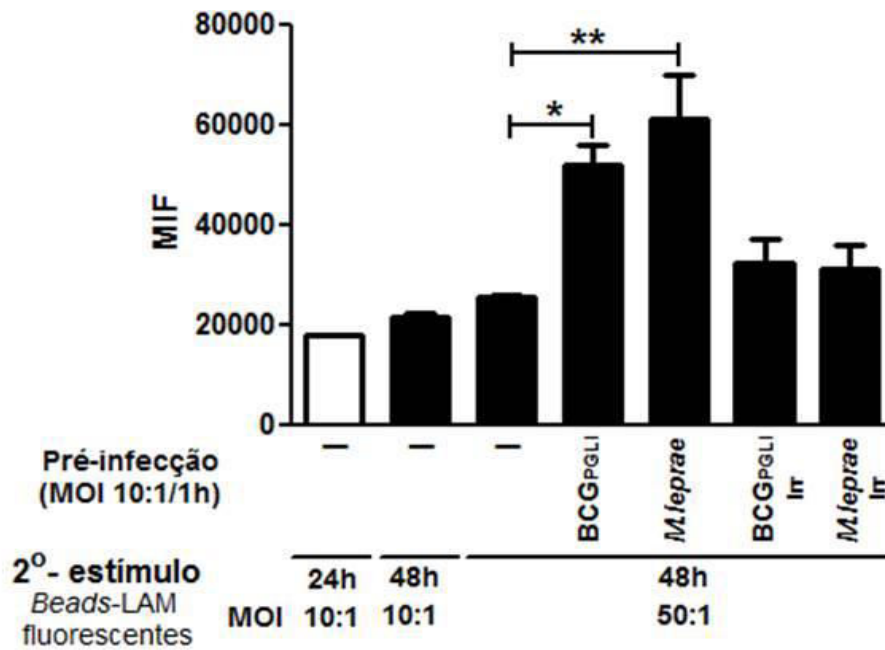


Figura 24. O pré-estímulo com micobacterias vivas expressando PGLI favorece a entrada de “beads” recobertos com Man-LAM em CS. “Beads” verdes fluorescentes foram recobertos com Man-LAM de *M. leprae* e adicionados a culturas de CS após o pré-estímulo com *M. leprae* ou BCGPGLI (MOI 10:1). Os beads foram incubados por 48h a 33°C numa proporção de 50:1. A intensidade média de fluorescência (MIF) foi determinada por citometria de fluxo no canal FL1 (verde). Os valores são médias \pm SEM de 3 experimentos independentes.

A partir destes dados fomos avaliar por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência, a expressão do receptor CD206 em CS infectadas por *M. leprae* ou BCGPGLI. Para a detecção do receptor de manose CD206, usamos em células permeabilizadas o anticorpo anti CD206 que reconhece tanto o epítipo intracelular quanto extracelular. Esta decisão foi importante, pois este receptor sofre endocitose e é reciclado pela célula. Os resultados obtidos mostram que a infecção por *M. leprae* ou BCGPGLI leva a um aumento na expressão de CD206 nas CS (Figura 25 A-B). O nível de fluorescência de CD206 na célula não infectada é igual ao nível basal de fluorescência da célula sem marcação.

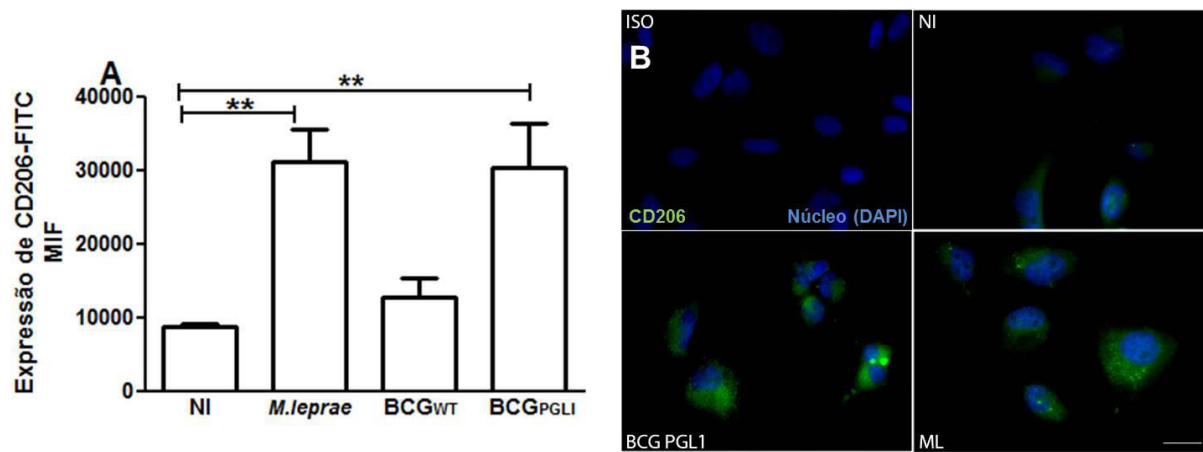


Figura 25. BCGPGLI e *M. leprae* vivo induzem a expressão de CD206 em células de Schwann.

A) Citometria de fluxo, e B) Microscopia de Fluorescência mostrando a expressão do receptor de manose em CS não infectadas e infectadas por *M. leprae* ou BCGPGLI após 24h. As células foram imunomarcadas com anticorpos anti-CD206 conjugado a Fitc (clone15-2, Mouse IgG1, κ 1, Biologend) e com isotipo conjugado com Fitc. Escala: 10 μ M (linha branca). Os valores são médias \pm SEM de 3 experimentos independentes.

O receptor de manose tipo 1, CD206, é codificado pelo *mrc1*. Para reforçarmos ainda mais a capacidade do *M. leprae* e do BCGPGLI em induzir a expressão deste receptor, fomos verificar esta modulação ao nível transcricional. Para isto, fizemos uma análise da expressão gênica de *mrc1* em diferentes tempos de infecção (4, 24 e 48h) por PCR quantitativo. Usamos como controle negativo o BCG selvagem. Os resultados são apresentados em termos de “fold change” após normalização com o gene constitutivo *rpl13*. Observamos que tanto *M. leprae* quanto BCGPGLI foram capazes de induzir a transcrição do gene *mrc1* em CS. Além disto, a transcrição do gene *mrc1* é um fenômeno que acontece precocemente na infecção, sendo o tempo de 4h pós infecção de maior expressão gênica. Só neste tempo observamos que a infecção com BCGWT também resultava numa indução de *mrc1*, mas com uma eficiência de apenas 50% ou menos em comparação com as bactérias que expressam PGLI. No tempo de 24h pós infecção com *M. leprae* ou BCGPGLI ainda podemos observar uma diferença significativa, que não é mais evidenciada em tempos mais longos de infecção (48h). (Figura 26 A-C).

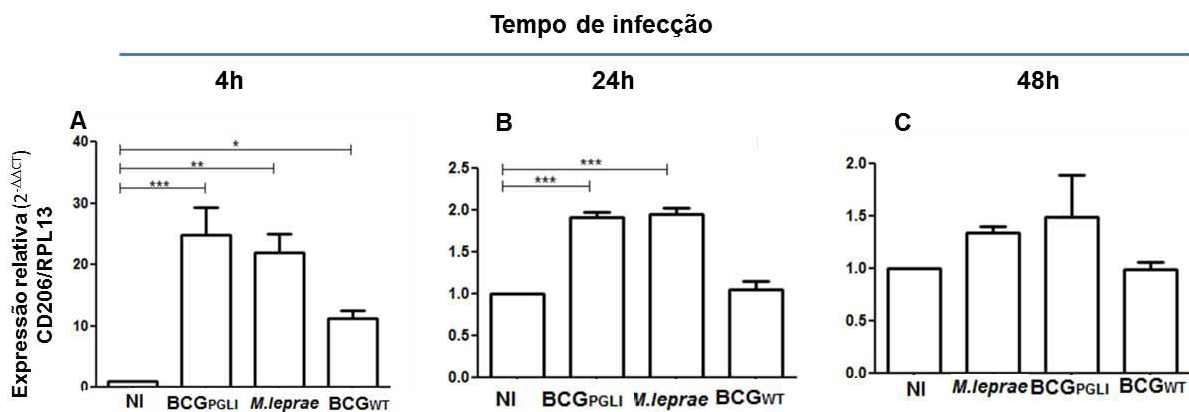


Figura 26. A infecção por BCGPGLI ou *M. leprae* vivo aumenta a transcrição de *mrc1* em células de Schwann. Os níveis de mRNA foram quantificados por PCR quantitativo. Expressão relativa normalizada do gene *mrc1* (delta delta Ct) em CS incubadas por 4, 24 ou 48h com BCGPGLI, *M. leprae* ou BCGWT a MOI 50:1. Os resultados são exibidos em termos de “fold change” após a normalização com mRNA de *rpl13*.

Com o intuito de entender ainda mais o papel deste receptor na infecção de CS pelo *M. leprae*, realizamos em seguida, um experimento de “knockdown” do gene *mrc1*. O resultado do teste de verificação do silenciamento se encontra na figura 27. Após a verificação do funcionamento do silenciamento, pré-estimulamos a CS, transfectadas com RNA de interferência (siRNA) para o gene *mrc1* (siRNA *mrc1* e siRNA*mrc1*) ou com siRNA “scramble” (controle) com *M. leprae* na MOI 10:1/1h. O segundo estímulo foi feito com BCGWT marcado com PKH67 na MOI 50:1/48h. Observamos por citometria de fluxo que o “knockdown” do gene reduz a internalização do BCGWT em aproximadamente 30% (Figura 28). Esta redução foi também evidenciada em ensaios de microscopia de fluorescência onde podemos observar (setas brancas) uma redução do número de BCGWT internalizado pela célula pré-estimulada com *M. leprae* quando comparada à célula com a expressão do gene *mrc1* diminuída (Figura 28 F-G). A figura 28 A-C representa o controle de internalização do *M.leprae* e do BCGWT, respectivamente. A figura 28 D representa o controle da co-infecção. O efeito do “knockdown” do CD206 na internalização de *M. leprae* foi avaliado através de citometria de fluxo. Foi observado que o knockdown não afetou a internalização do bacilo na célula de Schwann.

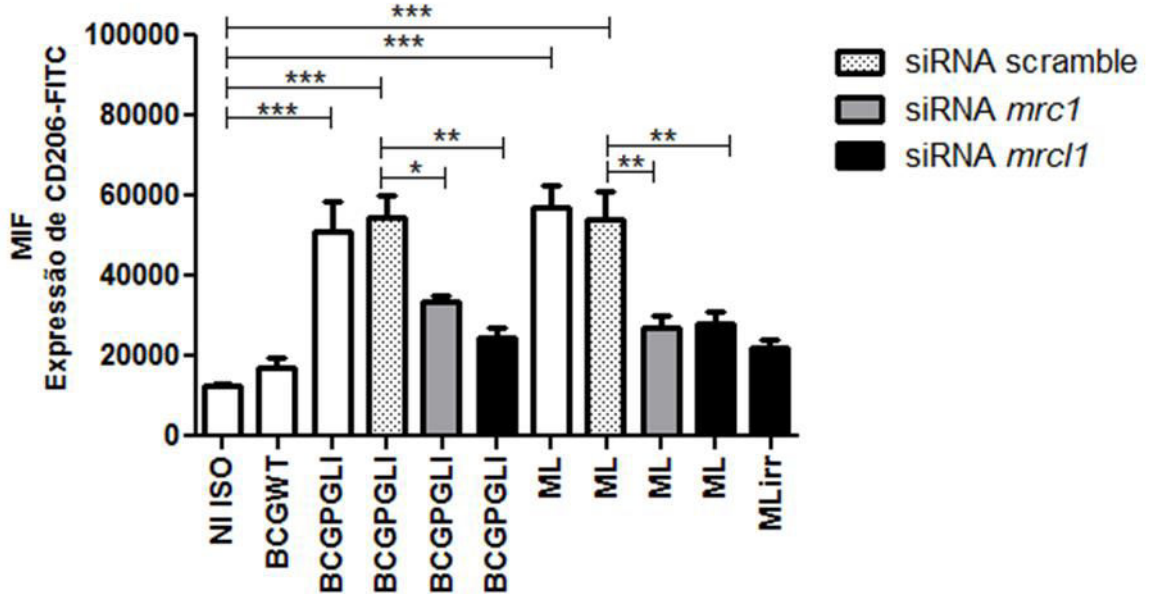
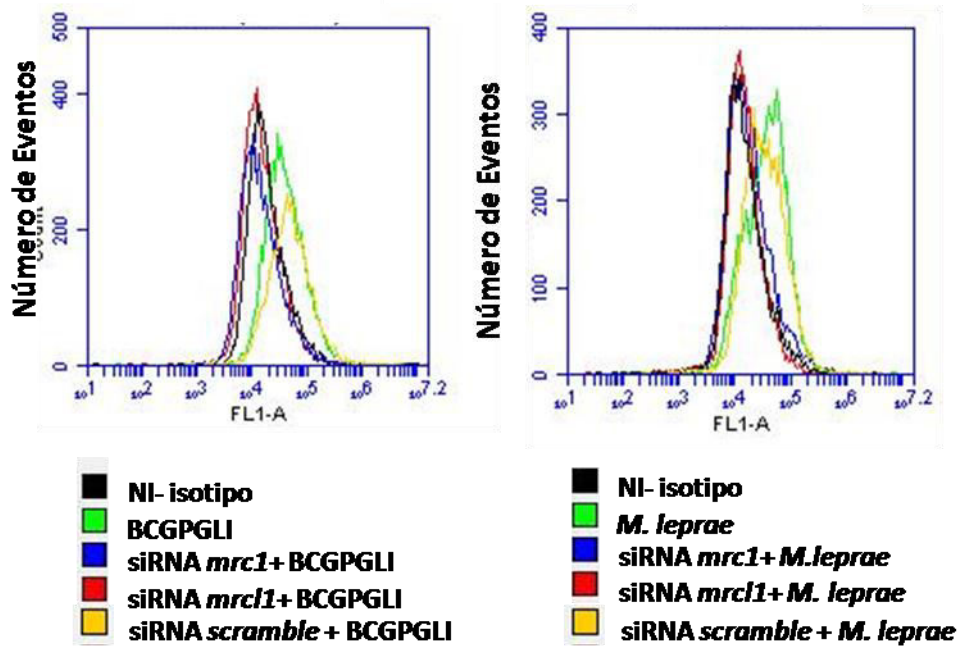


Figura 27. Verificação do funcionamento do silenciamento do gene que codifica CD206. Citometria de fluxo mostrando que o knockdown do gene do receptor de manose com siRNA *mrc1* ou *mrc1* diminui a expressão de CD206 tanto na presença de BCGPGLI como de *M. leprae*. As células foram imunomarcadas com anticorpos anti-CD206 conjugado a FITC (clone15-2, Mouse IgG1, κ 1, Biologend) e com isotipo conjugado a FITC. Os histogramas representativos mostram a fluorescência (FL1). Como controle, foi avaliada a internalização de BCGWT na presença do pré-estímulo de *M. leprae* em células transfectadas com o "scramble" siRNA o sem siRNA (colunas brancas). Os valores são médias \pm SEM de 3 experimentos independentes.

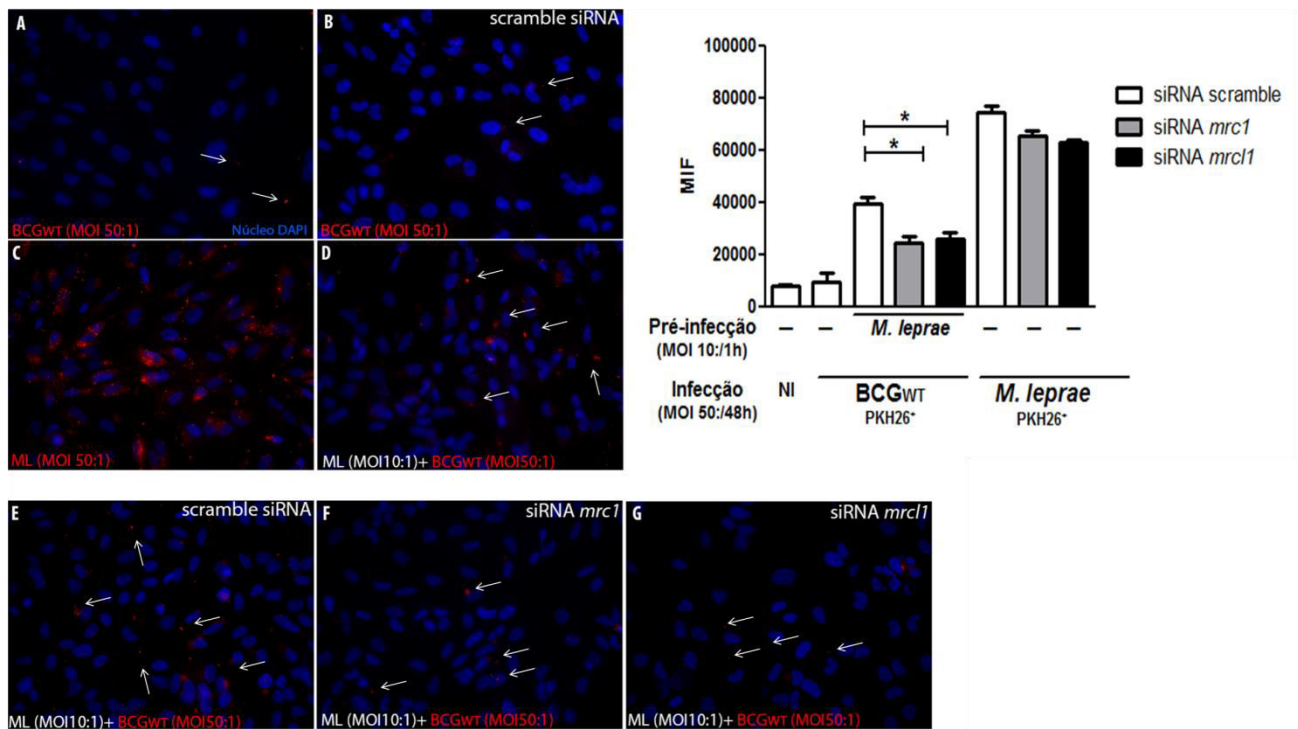


Figura 28. O knockdown do receptor de manose afeta o grau de internalização de BCGWT na célula de Schwann. O efeito do knockdown foi avaliado por microscopia de fluorescência. O painel superior (A-D) mostra células infectadas com BCGWT com e sem “scramble”siRNA, a internalização na co-infecção assim como a internalização de *M. leprae* como controle. O painel inferior (E-G) mostra as células com co-infecção, e tratamento com siRNA (*scramble*, *mrc1* e *mrc11*) (representativa de três experimentos independentes). Aumento de 40X. Escala (linha branca) representa 10 μ m. O efeito do knockdown do gene do receptor de manose com siRNA *mrc1* ou *mrc11* foi também avaliado por citometria de fluxo. O grau de internalização de BCGWT ou *M. leprae* marcados com PKH26 foi medido no canal FL-2. Como controle foi avaliada a internalização de BCGWT na presença do pré-estímulo de *M. leprae* e “scramble”siRNA.

5.6 “Cross talk” entre PPAR γ e CD206 em células de Schwann infectadas com *M. leprae* e BCGPGLI.

Diversos grupos de pesquisa têm mostrado que a expressão do RM pode ser modulada tanto *in vivo* como *in vitro* por muitos agentes. Os níveis de CD206 são “upregulados” por interferon α e β , 1,25-dihidroxitamina D3 prostaglandina E2 (PGE2), interleucina IL-4 e IL-13 e são “downregulados” por interferon- γ (94). Adicionalmente, Coste e colaboradores, em 2003, descreveram que o fator de transcrição PPAR γ ativa a transcrição do gene do receptor de manose em macrófagos murinos (95). Com base nestes dados, nos perguntamos se poderia existir alguma relação entre este fator de transcrição e o aumento da expressão de CD206 induzida pelo *M. leprae* e BCGPGLI vivos em CS infectadas.

Para responder a esta pergunta, primeiramente avaliamos a modulação da expressão do fator de transcrição PPAR γ nas CS infectadas com BCGPGLI e *M. leprae* através da técnica de “western blotting”. O resultado representativo de dois experimentos mostrado na Figura 29 indica que BCGPGLI e *M. leprae* induzem a expressão de PPAR γ . O BCGWT não induz a expressão de PPAR γ . Isto corrobora com os resultados observados para a expressão de CD206.

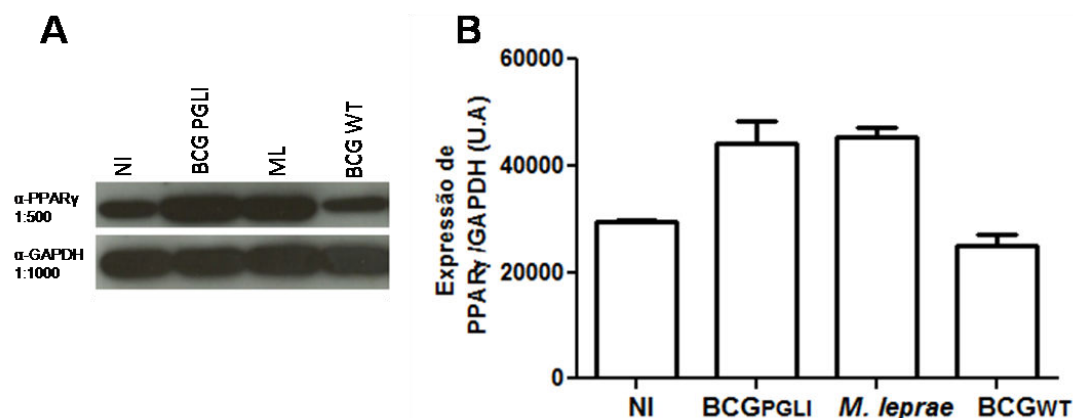


Figura 29. BCGPGLI e *M.leprae* vivos induzem a expressão de PPAR γ .

A) Lisado total de CS (20ug por poço) foram submetidos a Western Blotting para PPAR γ e GAPDH. Esta imagem é representativa de dois diferentes “blots”. B) O gráfico representa a análise densitométrica (A.U.=unidades arbitrárias) das bandas dos “Western blottings”.

Numa etapa seguinte analisamos o papel funcional do fator de transcrição PPAR γ na indução de CD206 no contexto de CS. As CS foram tratadas com 5 μ M de GW9662, um potente antagonista de PPAR γ por 30 minutos. Após este tempo foi feita a infecção com *M.leprae* e BCGPGLI por 24h. O efeito da inibição de PPAR γ na expressão de CD206 foi avaliado por citometria de fluxo. A figura 30 A mostra uma redução na expressão de CD206 nas células infectadas com *M.leprae* e BCGPGLI após tratamento com GW9662. Este efeito não foi observado na célula estimulada por BCGWT. Resultados semelhantes foram observados por microscopia de fluorescência, onde as setas brancas indicam células CD206⁺ (Figura 30). O efeito da inibição do PPAR γ na internalização de *M. leprae*, BCGPGLI e “beads” PGLI foi avaliada através de citometria de fluxo. Foi observado que o tratamento com esta droga não afetou a internalização de *M.leprae*, BCGPGLI ou “beads” PGLI na CS.

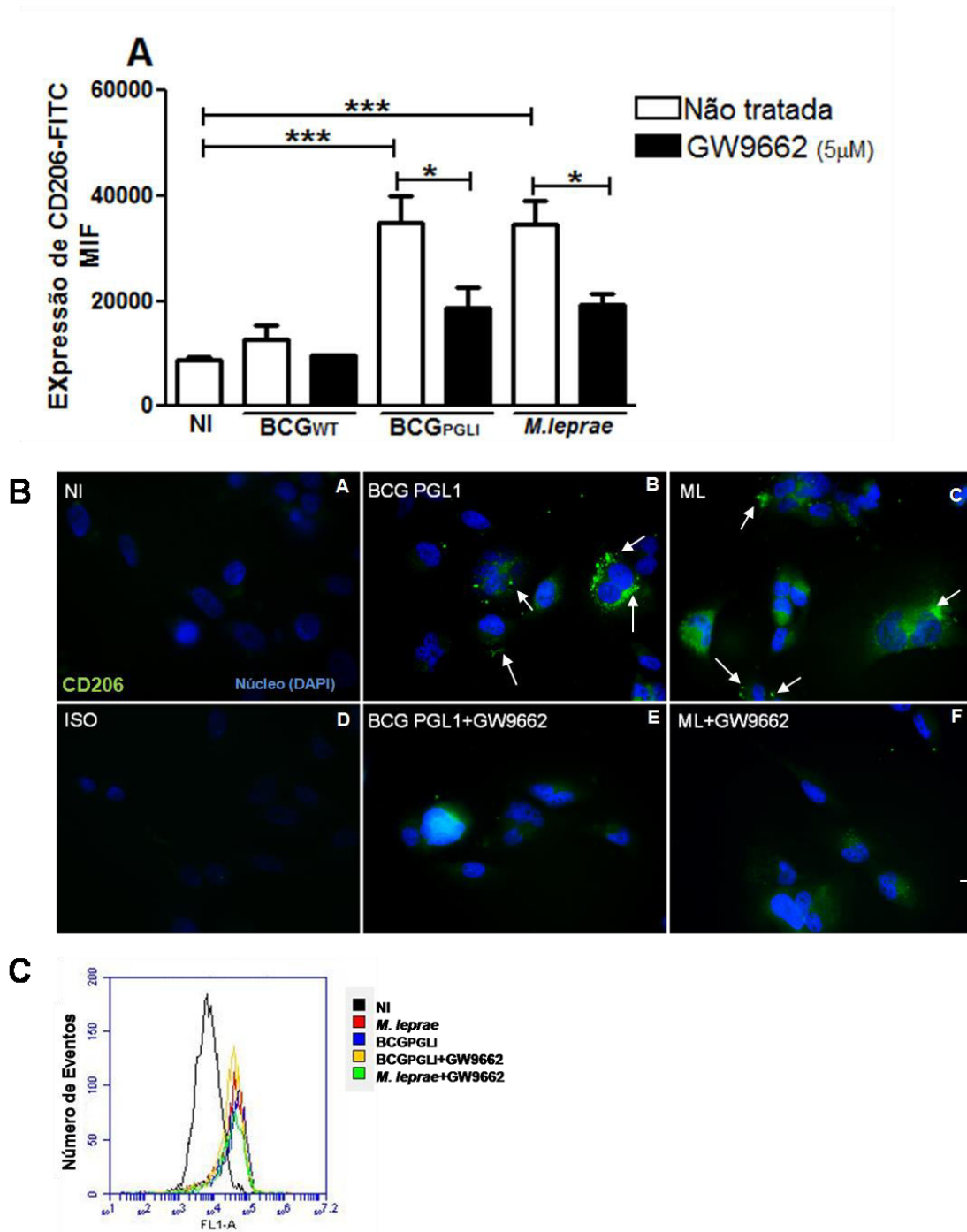


Figura 30. A inibição de PPAR γ bloqueia a expressão de CD206 induzida por micobactérias vivas em células de Schwann.

CS-ST8814 foram tratadas com o antagonista de PPAR γ GW9662 (5µM por 30 minutos) antes da incubação por 24h com BCGWT, BCGPGLI ou *M. leprae* a MOI 50:1. A) A internalização das bactérias em presença de GW9662 e após 24h de incubação com CS foi avaliada como controle. O histograma representativo mostra que a droga não inibe a entrada dos bacilos. B, C) A expressão de CD206 foi determinado usando citometria de fluxo e microscopia de fluorescência por marcação imunofluorescente de CD206 com anticorpo anti-CD206 conjugado com Fitc (Biolegend). O tratamento com GW9662 diminuiu a expressão de CD206 em CS. O núcleo está marcado com DAPI (azul) (magnificação x63). Escala (linha branca) representa 10 µm.

Para verificar se a diminuição da expressão de CD206 revertia o efeito da maior susceptibilidade de infecção observada nas células tratadas com *M.leprae* e BCGPGLI, pré-tratamos as CS com o antagonista GW9662, igualmente como descrito acima, infectamos com a primeira “onda” e incubamos em seguida com “beads” fluorescentes recobertas ou não com LAM. O resultado observado mostra uma diminuição significativa na internalização das “beads” cobertas com ManLAM pelas CS infectadas e tratadas com GW9662 quando comparada às CS não tratadas com o antagonista (Figura 31).

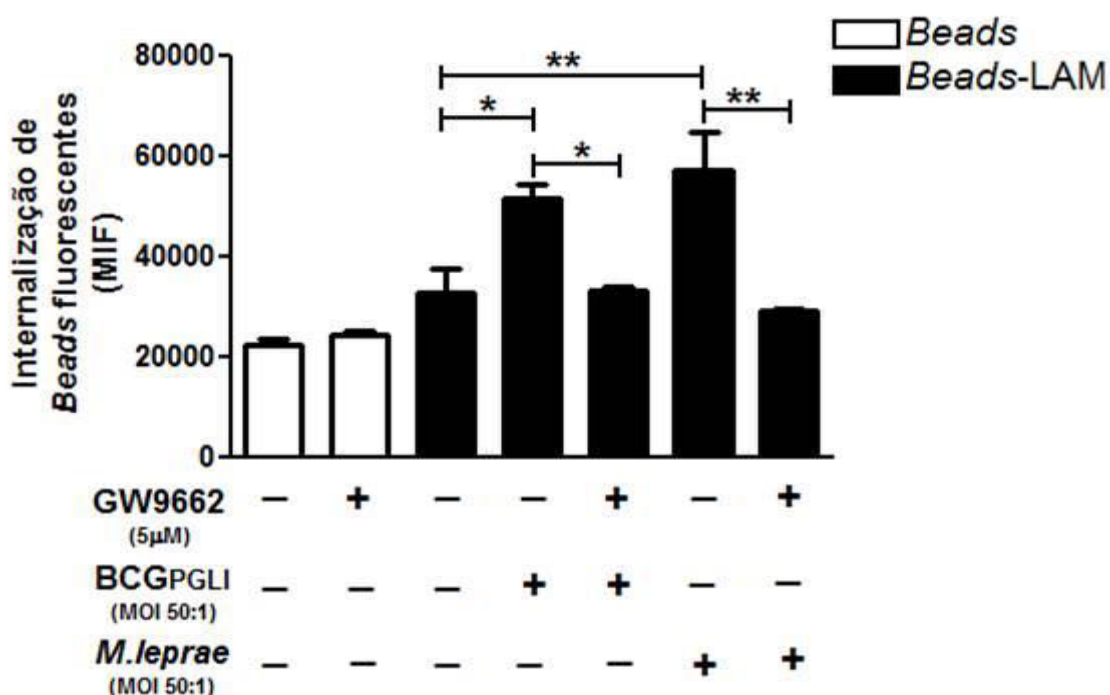


Figura 31. A inibição da atividade de PPARY diminui a internalização de beads recobertos com LAM em células de Schwann.

CS-ST8814 foram tratados com GW9662 5µM por 30 minutos prévio ao pré-estímulo com *M. leprae* ou BCGPGLI vivo (MOI 10:1). Após uma hora de pré-estímulo as células foram incubadas com “beads” ou “beads” cobertos com LAM a uma proporção de 50:1. A internalização dos “beads” verdes fluorescentes foi determinada por citometria de fluxo (canal FL1). O resultado mostra a MIF das células com beads fluorescentes internalizados.

5.7 A indução de CD206 promovida pela infecção com *M. leprae* ou BCGPGLI leva a um aumento de produção de IL-8.

Recentemente alguns artigos têm mostrado evidências de que receptores de lectina tipo C podem induzir a secreção de citocinas isoladamente ou em cooperação com TLRs (88,89). Em 2007, Tachado e colaboradores (93) mostraram que macrófagos, após interagirem com o fungo *Pneumocystis*, secretavam a citocina IL-8, e que esta secreção requeria a co-expressão do receptor de manose e de TLR2. Além disto, dados da literatura indicam que PPAR γ quando ativado heterodimeriza com RXR e se liga ao elemento de resposta a PPAR γ presente na região promotora dos genes que codificam IL-8 e COX2 aumentando sua expressão (87).

Portanto, a partir dos resultados obtidos com o antagonista de PPAR γ , onde evidenciamos uma ligação positiva entre CD206 e PPAR γ , decidimos avaliar se esta interação exibia uma conexão com a produção de Interleucina IL-8 pelas CS infectadas ou não com *M. leprae* e BCGPGLI. Para isto, analisamos se a redução da expressão do receptor de manose afetaria a secreção de IL-8 pelas CS infectadas e não infectadas com *M. leprae* ou BCGPGLI e qual o efeito do antagonista GW9662 neste contexto.

Os resultados obtidos mostram que o “knockdown” com *mrc1* e *mrc11* teve um impacto nas CS infectadas com *M. leprae* e com BCGPGLI, reduzindo a secreção de IL-8 aos níveis da célula não infectada (Figura 32). Este efeito não foi evidenciado quando CS foram tratadas com o siRNA “scramble” (Figura 32). Além disto, o estímulo com os “beads” revestidos ou não com PGLI também não induziu a secreção de IL-8 pelas CS.

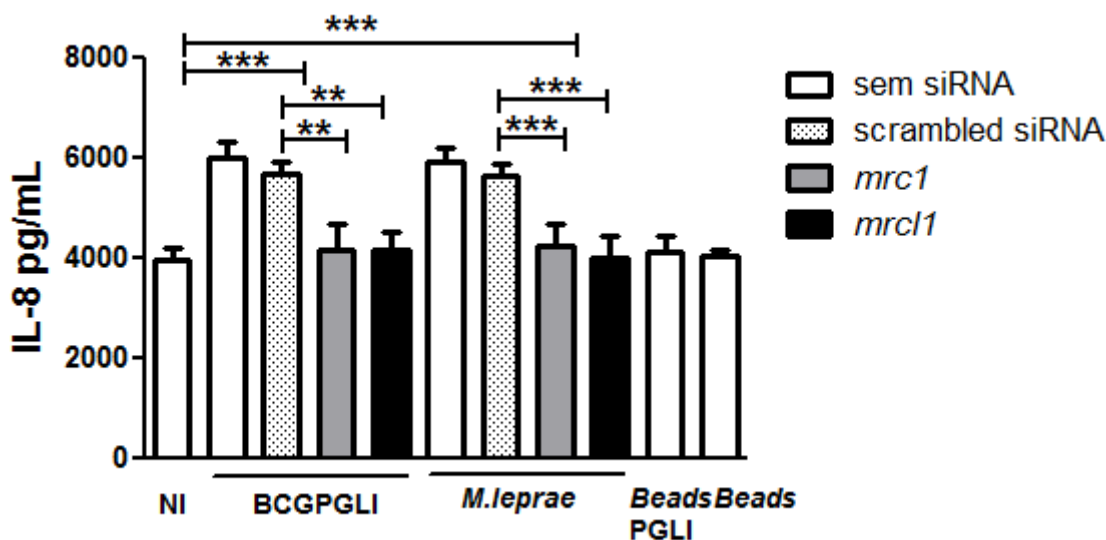


Figura 32. O knockdown de CD206 reduz a liberação de IL-8 induzida por *M. leprae* ou BCGPGLI. CS- ST8814 foram transfectados com “siRNA scramble” (controle) ou siRNA para CD206 (*mrc1* ou *mrcl1*) por 24h antes da incubação com os bacilos ou os beads beads por um período adicional de 24h. Os sobrenadantes foram, então, colhidos e os níveis de IL-8 quantificados por ELISA. Os resultados estão expressos como média \pm SD de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3).

Para testar o envolvimento de PPAR γ na produção de IL-8 em CS, pré-tratamos com 5 μ M de GW9662 e subsequente as infectamos com *M. leprae*. Os resultados mostram que o pré-tratamento com antagonista de PPAR γ bloqueia a produção de IL-8 pelas CS infectadas com *M. leprae* vivo (Figura 33).

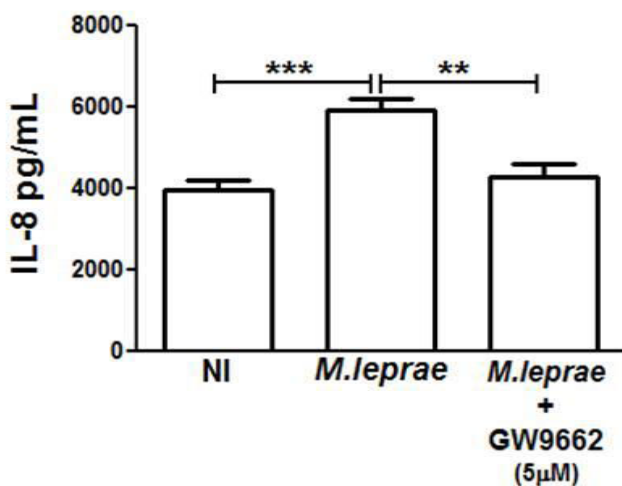


Figura 33. A inibição de PPAR γ bloqueia a liberação de IL-8 induzida por *M. leprae*. CS foram tratadas com o antagonista de PPAR γ , GW9662 (5 μ M) 30 minutos antes da infecção. Células foram posteriormente infectados com *M. leprae* por 48 h. A produção de IL-8 foi analisada por ELISA. Os resultados são expressos como média \pm SD de experimentos independentes realizados em triplicata (n = 3).

5.8 Formação de corpúsculos lipídicos em células de Schwann.

5.8.1 BCG_{PGLI} induz a formação de CLs em células de Schwann da linhagem ST8814

Nossos resultados indicam que PPAR γ é induzido e ativado na CS após infecção com as micobactérias vivas que expressam PGLI. O envolvimento deste fator nuclear na biogênese de CLs induzida por BCG em macrófagos infectados havia sido previamente comprovado (96). Como *M. leprae* também induz a formação de CLs em CS (19), numa etapa seguinte deste trabalho avaliamos tanto o envolvimento do PGLI como de PPAR γ na formação de CLs induzidos pelo *M. leprae* nesta célula. Para tal, usamos as cepas de BCG recombinantes como ferramenta para avaliar a formação de CLs em CS-ST8814, comparando com *M. leprae* e outras micobactérias. CS foram incubadas com BCG_{PGLI}, BCG_{PGLTB}, BCG WT ou *M. leprae* na MOI de 50:1 por 48h a 33°C em meio com 2% SFB. As células foram posteriormente marcadas com tetróxido de ósmio para evidenciar os CLs. Como mostra Figura 34, inclusões citoplasmáticas negras em abundância que representam os CLs foram observadas apenas nas células infectadas com BCG_{PGLI} e *M. leprae*. BCG_{WT} e BCG_{PGLTB} não induziram a formação de CLs (Figura 34).

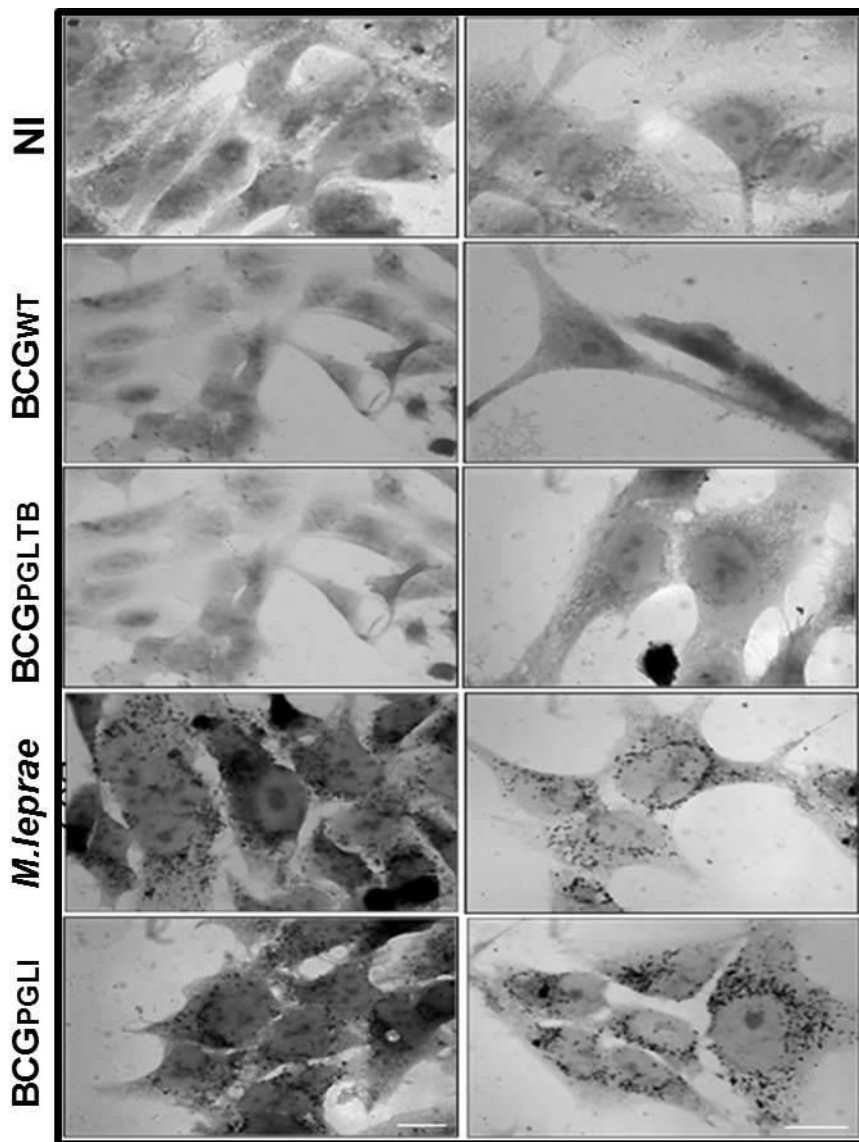


Figura 34. BCGPGLI e *M.leprae* (MOI 50:1) induzem a formação de CLs em células de Schwann da linhagem ST8814. CLs foram visualizados após incubação por 48h/33°C como inclusões pretas citoplasmáticas após marcação com tetróxido de ósmio. Barra= 10µM

Confirmamos estes resultados utilizando uma marcação alternativa para CLs com o corante fluorescente vermelho Oil red-O (ORO). Estes dados foram quantificados e apresentados na Figura 35 A. Podemos observar que BCGPGLI e *M.leprae* vivos induzem a formação de CLs num nível similar e significativo. Neste experimento avaliamos também se a molécula de PGLI, *per se* seria capaz de induzir estas organelas. Para isto, recobrimos "beads" de látex com o glicolípido PGLI. Utilizamos também em paralelo "beads" revestidas com ND-o-BSA para verificar se a porção dissacarídica terminal do PGLI seria essencial neste processo. Observamos que uma vez internalizados, os "beads" recobertos com PGLI induziram

significativamente a formação de CLs quando comparados aos “beads” controle ou às células não infectadas (Figura 35 B). No entanto, a área dos CLs/célula foi inferior quando comparada à área observada nas células infectadas com *M.leprae* ou BCGPGLI (Figura 35A-B). Observamos também que a porção dissacarídica terminal da molécula de PGLI não foi capaz de induzir a formação de CLs (Figura 35 B). Isto sugere que a porção lipídica ou mesmo a molécula inteira são importantes na sinalização induzida para a formação de CLs.

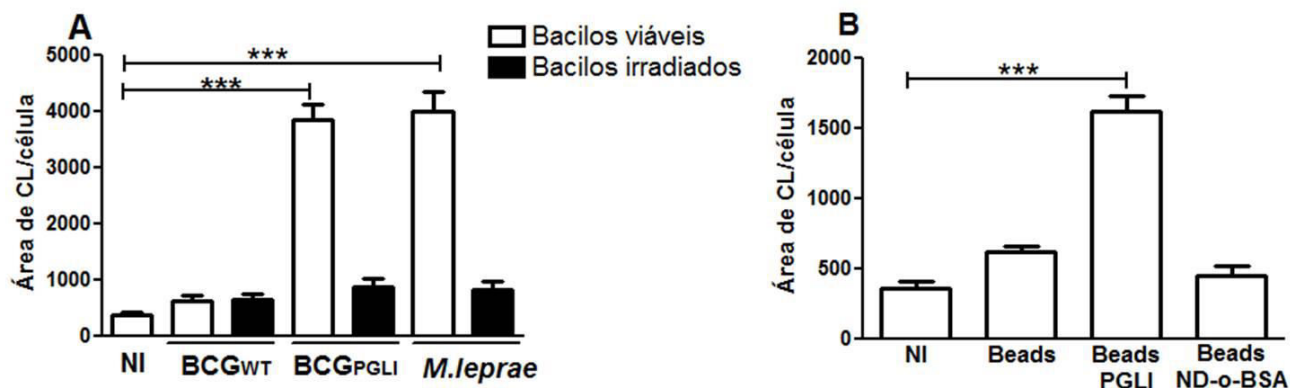


Figura 35. BCGPGLI vivo e “beads” PGLI internalizados induzem CLs em células de Schwann. Quantificação de corpúsculos lipídicos marcados com OIL RED O usando o software Image J. A quantificação está representada como área de CLs por célula. A) Cepas de BCG recombinante e *M.leprae* vivos e mortos incubados por 48h a 33°C e RPMI- 2% SFB. NI; não infectado. B) “Beads” de látex controle (cobertos com BSA), além de “beads” com PGLI e “beads” com ND-o-BSA foram incubados por 48h a 33°C e RPMI com 2% SFB. A significância das diferenças foi avaliada pelo teste ANOVA e Bonferroni: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001

Estes achados foram confirmados em CS humanas primárias (Figura 36).

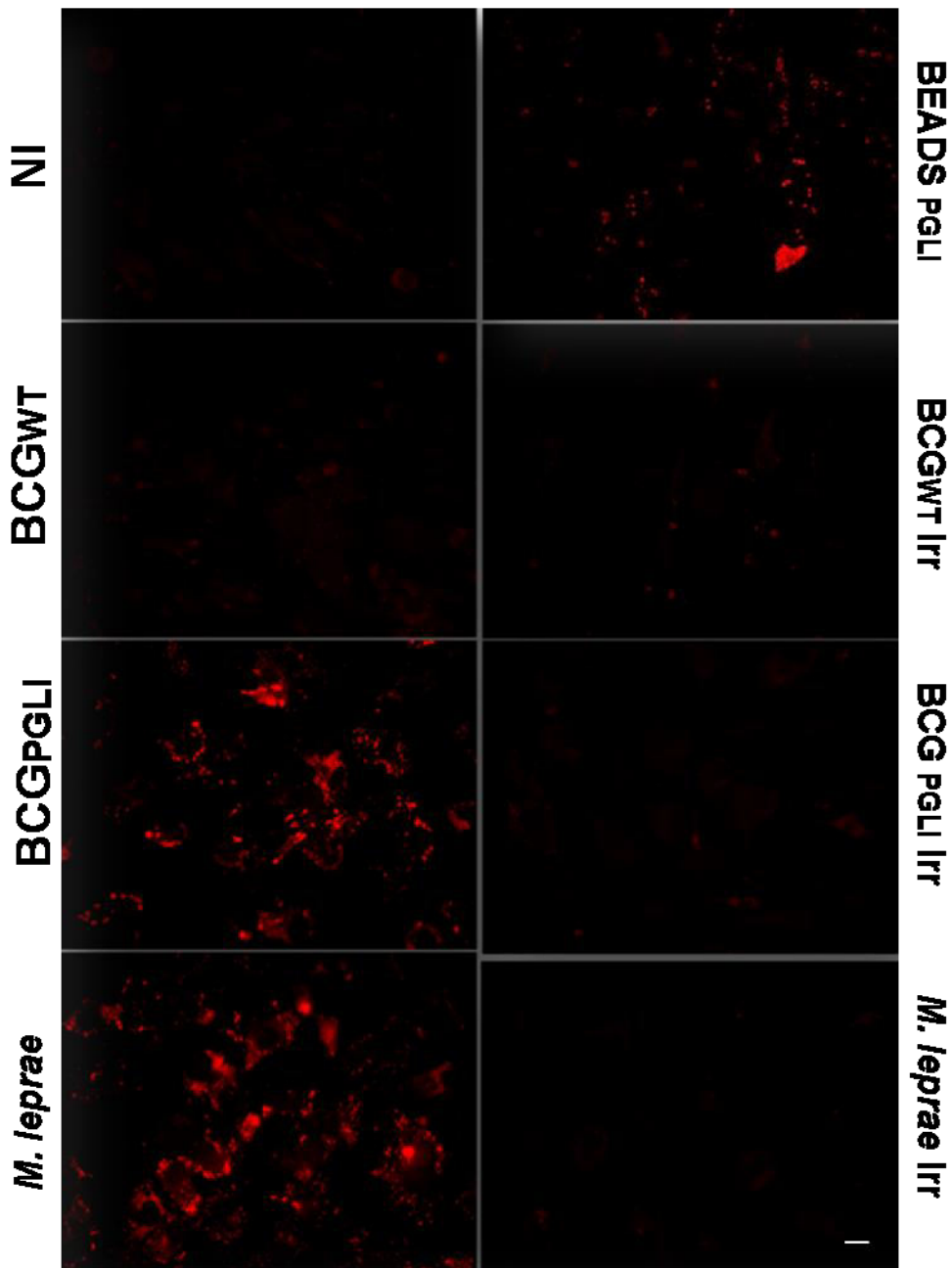


Figura 36. BCGPGLI vivo e “beads” PGLI induzem CLs em células de Schwann humanas primárias. Imagem representativa de microscopia de fluorescência mostrando a formação de CLs em CS humanas primárias após incubação com BCGWT, BCGPGLI, *M.leprae* vivos ou mortos e “Beads” PGLI (proporção 50:1) por 48h/33°C usando RPMI com 2% SFB. CLs são visualizados como organelas citoplasmáticas vermelhas após marcação com Oil Red O. Escala 10µM.

Os resultados obtidos reforçam a idéia de que a internalização é um fator determinante no processo de indução de CLs na célula de Schwann. Surgiu então outro aspecto interessante a ser avaliado. Conseguiria BCGWT induzir a formação de CLs se fosse internalizado pela célula de Schwann? Para responder esta

questão, realizamos ensaios de pré-infecção com BCGPGLI como descrito anteriormente. Nos primeiros ensaios, fizemos uma pré-infecção com BCGPGLI na MOI de 10:1. O segundo estímulo foi feito com BCGPGLI, *M. leprae* irradiados ou com BCGWT na MOI de 50:1. Este ensaio mostrou que durante a co-infecção a entrada do BCGWT na célula de Schwann não levou à indução de CL de maneira significativa quando comparado com o nível induzido por BCGPGLI MOI 10:1. BCGPGLI morto e *M. leprae* morto também não induziram significativamente quando comparado com BCGPGLI (MOI 10:1) (Figura 37).

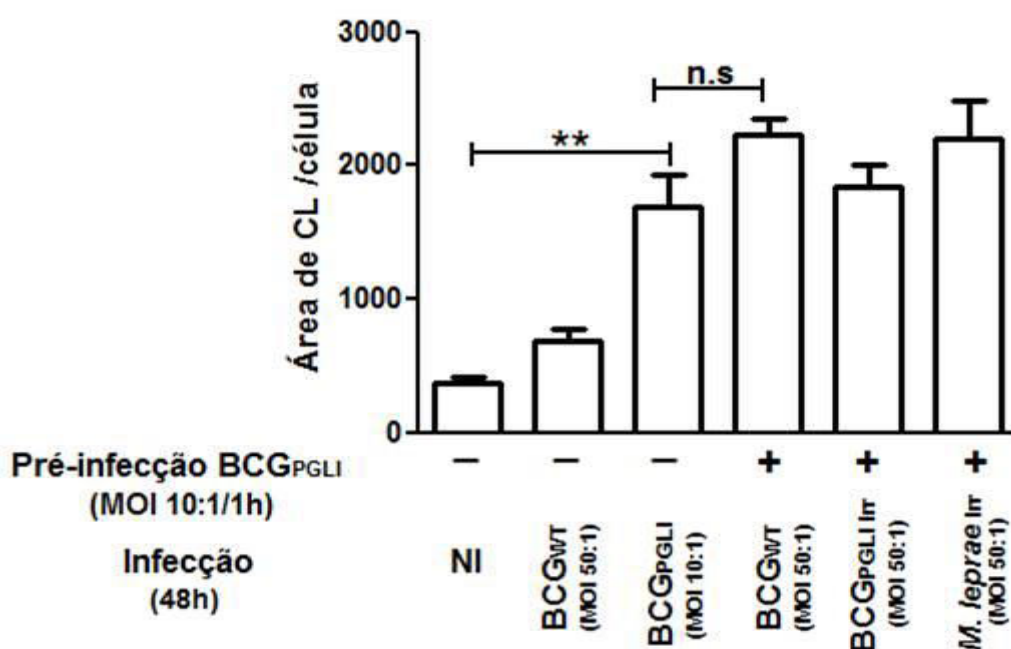


Figura 37. A internalização de BCGWT na célula de Schwann não resulta na indução significativa de CLs. BCG WT, BCGPGLI irr ou *M.leprae* irr, MOI 50:1, foram incubados por 48h a 33°C e RPMI com 2% SFB após um pré-estímulo com BCGPGLI vivo (MOI 10:1). A quantificação de CLs marcados com OIL RED O foi feita usando o software Image J. Os valores são médias ± SEM de 3 experimentos independentes. A significância das diferenças foi avaliada pelo teste ANOVA e Bonferroni. ns=não significativo.

Uma dúvida que surgiu nos experimentos acima foi, se a MOI de 10:1 do BCGPGLI utilizada na primeira onda de infecção, por já ser capaz induzir uma quantidade alta de CLs, estaria dificultando a visualização do efeito da segunda "onda" de infecção. Para resolver esta questão, reduzimos a MOI da primeira "onda" para 5:1. O resultado mostra que a internalização do BCGWT induzida tanto por BCGPGLI quanto por *M. leprae* não foi capaz de levar à formação de CLs nas CS,

nem com a MOI de 50:1 ou 100:1 (Figura 38). A internalização de BCGWT com o pré-estímulo (5:1) foi corroborada tanto por citometria de fluxo como por microscopia (dados não mostrados). Ao contrário, parece existir uma diminuição no nível de CLs induzido pelo BCGPGLI ou *M.leprae* a MOI baixo (5:1) pela presença de BCGWT. O significado desta redução deve ser mais bem estudado.

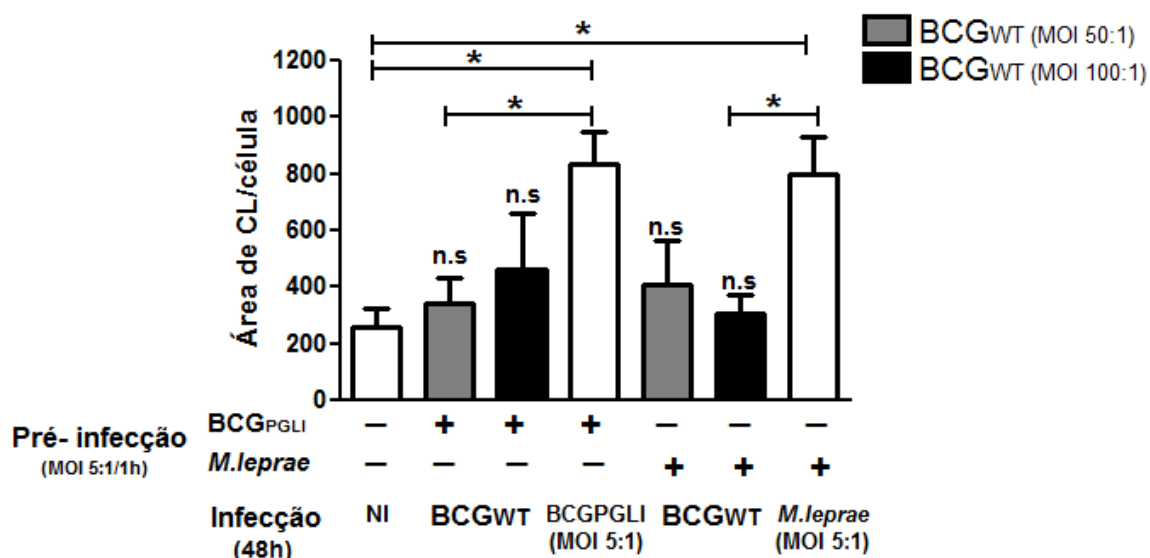


Figura 38. A internalização de BCGWT na célula de Schwann após o pré-estímulo com BCGPGLI (5:1) não resulta na indução de CLs. BCGWT, MOI 50:1 foi incubado por 48h a 33°C e RPMI com 2% SFB após um pré-estímulo com BCGPGLI vivo ou *M. leprae* (MOI 5:1). A quantificação de CLs marcados com OIL RED O foi feita usando o software Image J. Os valores são médias ± SEM de 3 experimentos independentes. Análise estatística comparativa foi realizada usando ANOVA e Bonferroni assumindo a condição não infectada (NI) como o valor basal para comparação. ns=não significativo. *, p<0.05.

Considerando a importância de receptores nucleares ativados por lipídeos no metabolismo lipídico, buscamos entender o papel do PGLI na modulação do fator de transição PPAR γ na CS. Inicialmente definimos a concentração ótima de GW9662 nas CS. Para isso foram avaliadas as concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M de GW9662. Foi testado também a citotoxicidade do composto nas diferentes concentrações através do ensaio de MTT (dados não mostrados). A concentração de 1 μ M não mostrou efeito sobre a formação de corpúsculos lipídicos. No entanto, a concentração de 10 μ M se mostrou tóxica para a célula. A concentração de 5 μ M mostrou efeito negativo na indução de CLs e não mostrou ser citotóxica. As CS foram então tratadas por 30 minutos com 5 μ M de GW9662. Posteriormente, foram incubadas com *M.leprae*, BCGPGLI viáveis ou com “beads” PGLI. As bactérias foram

marcadas com PKH67, a fim de acompanharmos a fagocitose dos bacilos. Como controle positivo, CS foram cultivadas em meio RPMI com 10% de SFB, condição em que, *per se* acumulam CLs. No controle negativo adicionamos 5 μ M de GW9662. Os resultados de microscopia de fluorescência (imagem e quantificação) estão apresentados na Figura 39 A-C. A Figura 39 A e B mostram, respectivamente, a associação do BCGPGLI ou *M. leprae* (em verde) e de "beads"-PGLI. Em ambos os ensaios vemos que o pré-tratamento com o antagonista de PPAR γ inibiu visivelmente a indução de CLs após a infecção com os bacilos ou estímulo com "beads"-PGLI. Estes resultados sugerem fortemente que a infecção de CS pelo *M. leprae* ou BCGPGLI induz a biogênese de CLs via PPAR γ e que o PGLI contribui de alguma maneira neste processo.

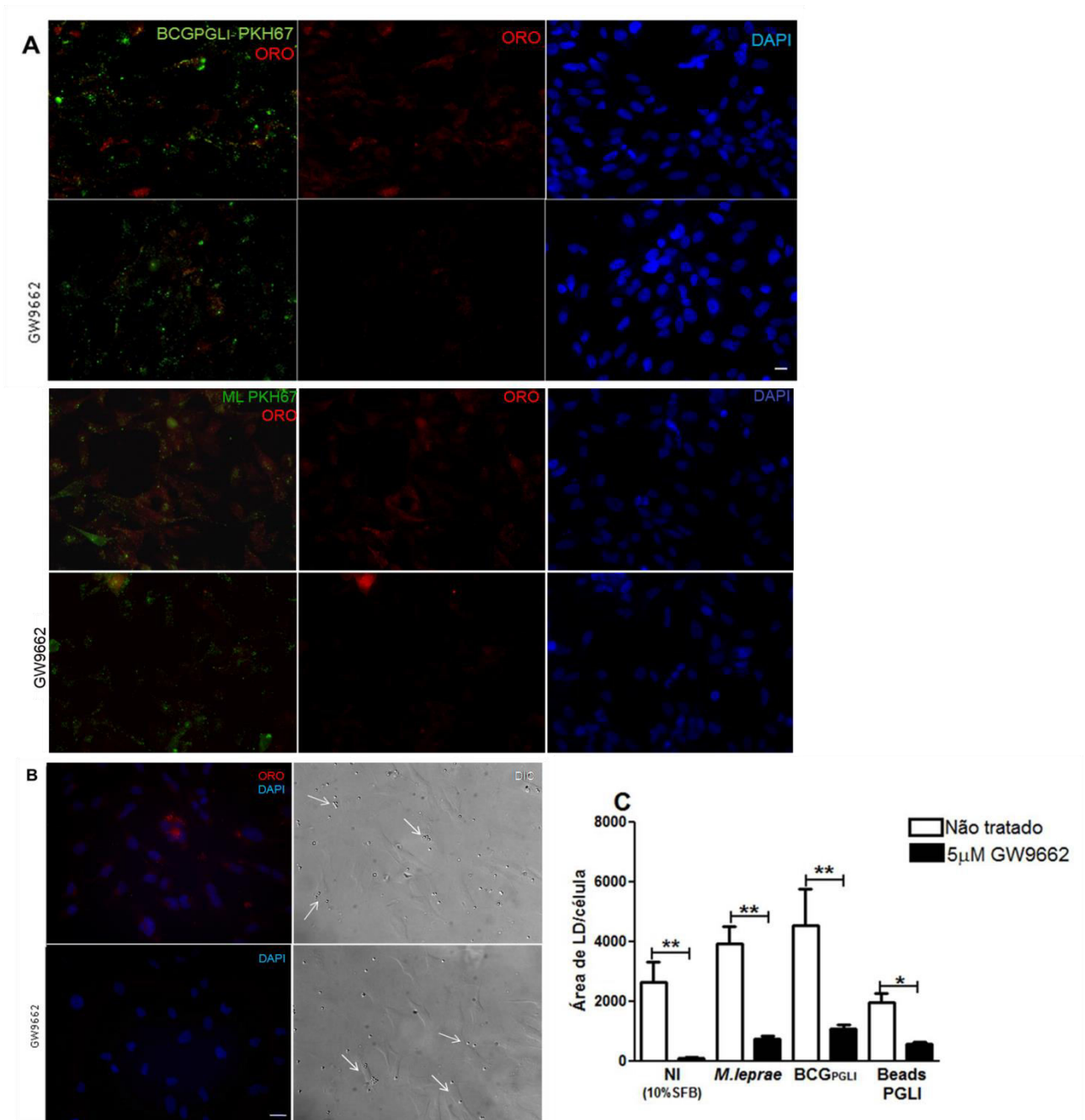


Figura 39. Microscopia de fluorescência mostrando que o pré-tratamento com GW9662 impede a biogênese de CLs induzido por BCGPGLI vivo, *M. leprae* vivo ou “beads”PGLI em células de Schwann. As células foram tratadas por 30 min com GW9662 (5uM) antes dos estímulos com bactérias ou “beads”. A) Na prancha superior os bacilos foram marcados com PKH67 (verde). B) Na prancha inferior os beads de látex são visíveis no DIC (setas brancas). Os CLs foram marcados com ORO (vermelho). O núcleo com DAPI (azul). Imagem representativa de três experimentos independentes. Escala 10μM. A quantificação de CLs foi feita usando o software Image J. Os valores são médias ± SEM de 3 experimentos independentes. A significância das diferenças foi avaliada pelo teste ANOVA e Bonferroni. *, p<0.05 ; **, p<0.01

Com base nestes resultados fomos avaliar a expressão gênica de *plin2* (gene que codifica ADRP) e *cd36*, genes envolvidos no metabolismo lipídico. Os resultados

mostram uma regulação positiva do gene *adrp* em CS infectadas com *M.leprae* ou BCGPGLI viáveis (Figura 40A). De forma semelhante, CS estimuladas com “beads”-PGLI também tiveram um aumento da expressão deste gene quando comparada as “beads” sem revestimento (Figura 40A). BCGWT e bacilos irradiados não afetaram a expressão gênica de *adrp*. Por outro lado, o pré-tratamento com GW9662 bloqueou a indução em todas as condições analisadas (Figura 40 A). Análises preliminares com relação à expressão do gene *cd36* mostram, de forma similar, que a infecção com BCGPGLI ou *M.leprae* aumenta a transcrição deste gene, e que BCGWT não afeta a expressão gênica de *cd36* (Figura 40B).

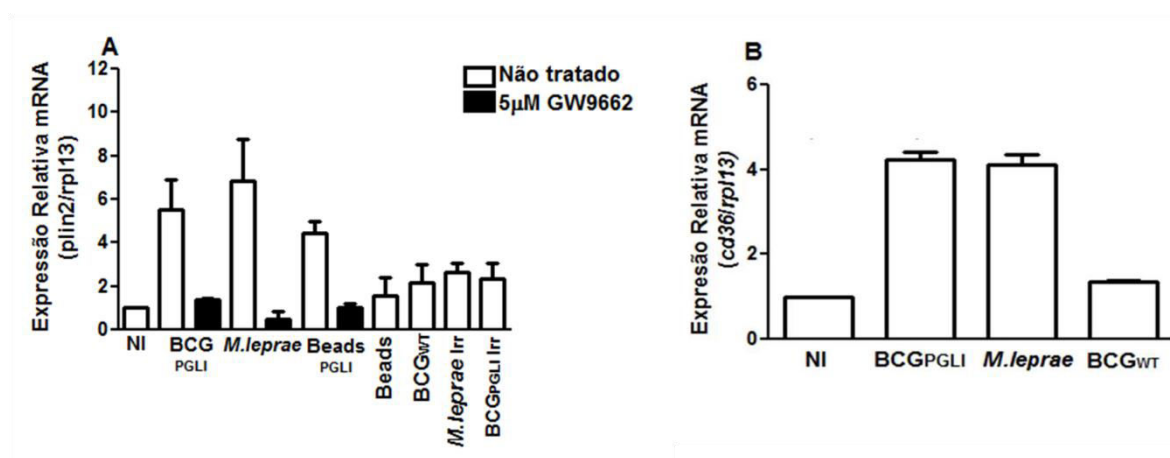


Figura 40. *M.leprae* e BCGPGLI vivo regulam positivamente a expressão dos genes *adrp* e *cd36* em células de Schwann. Detecção de mRNA de plin2 (ADRP) e *cd36* em CS da linhagem ST8814 incubados com *M.leprae*, BCGPGLI ou BCGWT a 33°C e RPMI com 2% SFB. RNA foi isolado 12h após a aplicação dos estímulos e a RT-PCR foi realizada. Os níveis de mRNA foram normalizadas usando o nível de expressão de *rp13*. O valor arbitrário de 1 foi atribuído à condição não infectada e os resultados foram expressos em valores relativos em relação ao controle. (n=2)

5.9 Identificação de complexos protéicos e interações proteína-ligante entre a molécula PGLI e células de Schwann por espectrometria de massas.

O PGLI, por ser uma molécula abundante, específica e localizada na parede celular do *M. leprae*, representa para o bacilo uma importante ferramenta na interação com a célula hospedeira, podendo facilitar a entrada do bacilo na célula, ativar vias de sinalização envolvidas em diferentes funções celulares e uma vez dentro da célula, o bacilo, via PGLI, pode também modular diferentes vias metabólicas favorecendo a sobrevivência intracelular do *M.leprae*, e participar do desenvolvimento das lesões neurais observadas na hanseníase.

Portanto, outro ponto de interesse nosso foi identificar potenciais ligantes desta molécula na CS que poderiam estar envolvidos na internalização do bacilo, a fim de compreender um pouco mais o papel deste glicolípídeo na hanseníase e particularmente na lesão neural. Nesse trabalho mostramos inicialmente que “beads” recobertos com PGLI são capazes de induzir CLs em CS, O que sugere que a internalização do PGLI e posterior interação com diferentes componentes intracelulares pode ser importante para a indução da biogênese de CLs e de outros processos biológicos. Logo esta parte do trabalho poderá abrir novas frentes de estudo que contribuirão para o melhor entendimento do papel do PGLI na hanseníase.

Para atender os objetivos desta parte do trabalho, nós utilizamos a estratégia de “pull-down” seguida de análise por espectrometria de massas a fim de identificarmos possíveis ligantes do PGLI presentes na fração enriquecida em proteínas de membranas de CS (PGLI-M). Utilizamos também o glicolípídeo PGLTB (PGLTB-M) com o objetivo de compararmos o perfil de proteínas ligadas a cada glicolípídeo e de tentarmos identificar proteínas “exclusivas” de PGLI. Posteriormente, através de análise quantitativa “label free”, comparamos a abundância das proteínas que se ligaram tanto a PGLI quanto PGLTB. Além da fração de proteínas de membrana obtivemos também dados proteômicos da interação entre PGLI e PGLTB com a fração de proteínas citosólicas da CS (dados ainda não analisados). O fluxograma desta parte do trabalho está descrito na Figura 41.

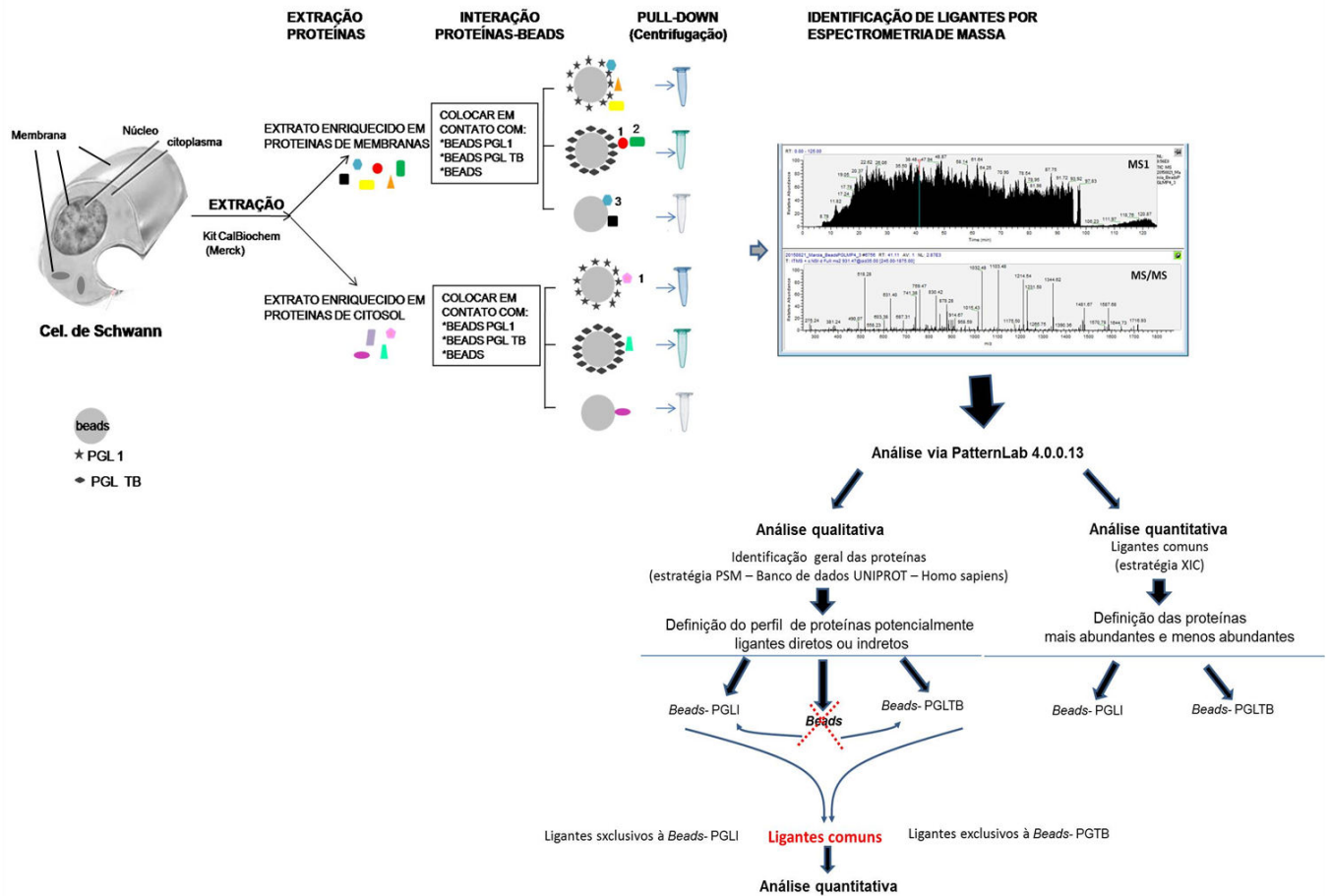


Figura 41 Esquema representativo da metodologia utilizada para identificação de proteínas de células de Schwann da linhagem ST8814 potencialmente ligantes de PGLI. Resumidamente, as CS foram lisadas e foi feita uma extração diferencial para obtenção de extratos enriquecidos em proteínas citoplasmáticas ou de membranas. Cada extrato foi incubado com “beads” recobertos com PGLI, PGLTB ou com “beads” sem revestimento (controle). Em seguida foram separados por “pull-down”, lavados com PBS e submetidos à digestão triptica para identificação das proteínas ligantes por espectrometria de massas (nLC-MS/MS). Os números 1 e 2 representam a interação direta e indireta de proteínas, respectivamente. O número 3 representa uma possível associação inespecífica. Os ligantes dos “beads” controle não foram considerados para a criação de redes de interação.

5.9.1 Otimização da aquisição de dados de LC-MS/MS.

Visando a otimização do método de aquisição dos dados, inicialmente analisamos o perfil de separação dos peptídeos ao longo de uma gradiente de acetonitrila por 36 minutos. O cromatograma TIC (contagem total de íons) da amostra enriquecida em proteínas de membrana provenientes da interação com “beads”-PGLI (PGLI-M), mostra a eluição dos íons a partir de 15 minutos. Foi possível verificar também que estes íons se concentraram em 20 minutos da corrida (Figura 42 A). Observamos também a presença de muitos peptídeos sendo co-eluídos simultaneamente (setas laranjas - Figura 42 B). Com isto, concluiu-se que haveria perda de informação ao utilizar este gradiente e decidimos modificar o protocolo. Foi então realizada outra corrida teste com uma nova amostra de PGLI-M, utilizando também uma gradiente de acetonitrila, mas agora, por 120 min. Observando a contagem total de íons ao longo do perfil cromatográfico, vimos peptídeos sendo eluídos entre o minuto 7 e 90, com intensidade alta (Figura 42 C). Também observamos que os peptídeos eluídos puderam ser fragmentados e geraram espectros de MS² de boa qualidade (Figura 42 D). Uma característica apenas das amostras de proteínas de membrana foi uma supressão de sinal entre 90 e 110 minutos de corrida (cromatograma da Figura 42C círculo azul). Esta característica se repetiu em todas as amostras desta natureza, mas não foi evidenciada com as amostras citoplasmáticas (Figura 42 E e F). Após estas observações, consideramos que este método de aquisição apresentou resultados satisfatórios e este método foi utilizado para a aquisição dos dados de MS/MS de todas as amostras.

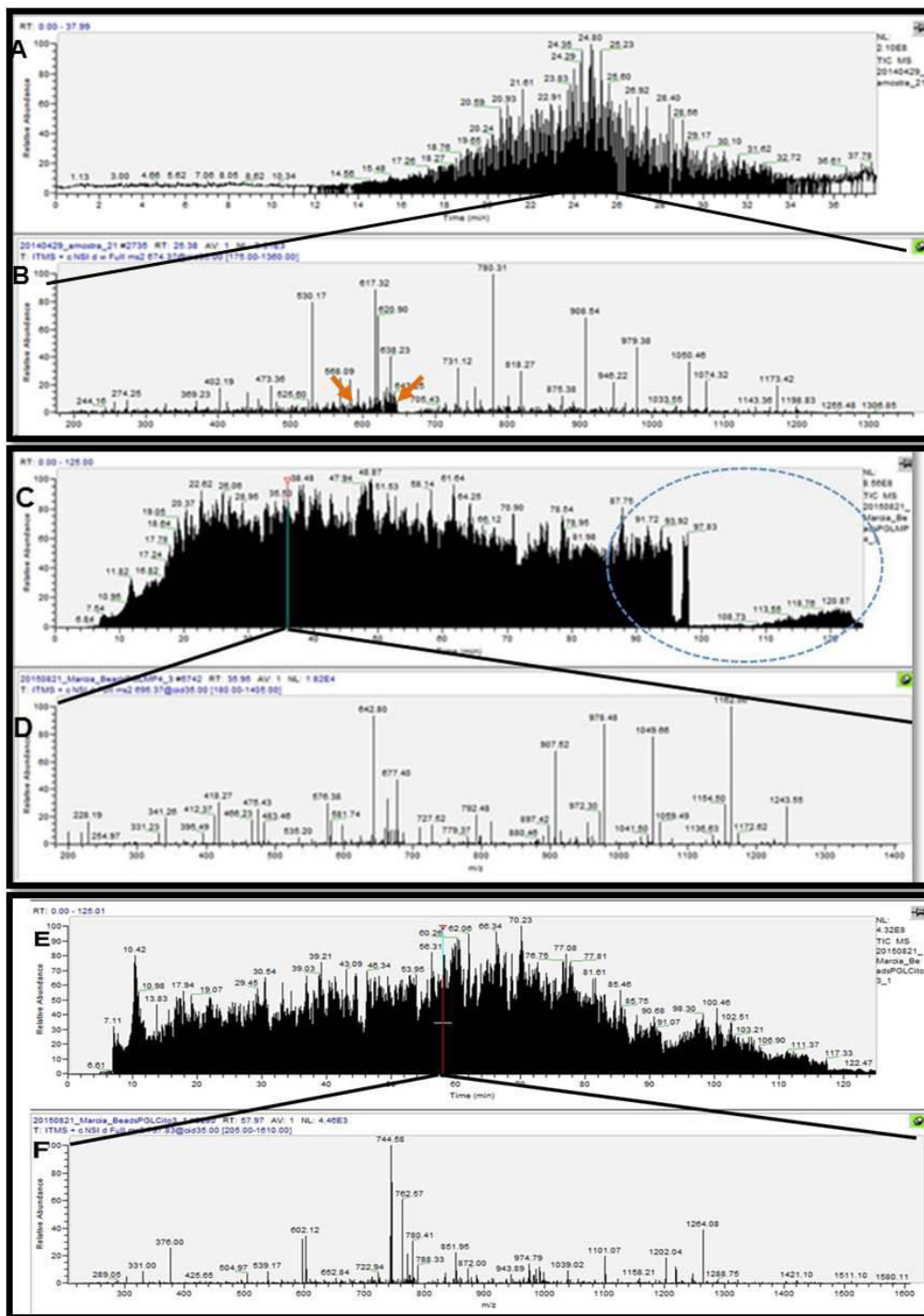


Figura 42. Comparação do perfil cromatográfico e espectros de MS obtidos entre os dois métodos de aquisição de dados de LC-MS/MS testados. A-D) Visualização de arquivo .RAW usando o programa XCalibur mostrando a corrida da amostra: “Beads” PGLI-Extrato de Membrana de célula de Schwann. A) Primeira corrida teste: Cromatograma TIC (contagem total de íons) mostrando a quantidade relativa dos íons detectados ao longo do tempo registradas durante a corrida teste que durou 36 minutos. As setas laranjas indicam peptídeos sendo co-eluídos simultaneamente. O círculo azul indica uma supressão de sinal. C) Segunda corrida teste: Cromatograma TIC com gradiente de 120 minutos. (Eixo y: Abundância Relativa ao pico base considerado 100%. Eixo x: tempo em minutos). E-F) Visualização de arquivo .RAW usando o programa XCalibur mostrando a corrida da amostra: “Beads” PGLI-Extrato de citosol de célula de Schwann. B, D, F) Espectro MS2 (fragmentação) correspondente a um determinado momento da corrida cromatográfica.

5.9.2 Identificação de ligantes diretos ou indiretos a PGLI-M e PGLTB-M.

Resulta importante ressaltar que estes dados foram obtidos nos meses finais da tese. Portanto, optamos por fazer neste momento, uma abordagem bem geral e especulativa. Além disto, em função da quantidade de dados gerados concentramos nossas análises nos resultados obtidos a partir das amostras PGLI-M e PGLTB-M. Como controle negativo utilizamos as “beads” sem revestimento (controle).

Iniciamos os estudos avaliando a robustez dos dados obtidos. Para isto, a primeira análise foi feita em termos de peptídeos gerados. Detectamos após análise por PSM usando Patternlab 4.0.0.13, 6872 peptídeos totais destes, 2815 (41%) peptídeos foram identificados apenas na amostra PGLI-M e 584 peptídeos (8,5%) em PGLTB-M. Os peptídeos em comum foram 3473 (50,5%). Esta informação foi filtrada, conforme descrito na metodologia, para retirada dos peptídeos redundantes que identificaram a mesma proteína e assim obter a tabela de proteínas identificadas.

Os peptídeos resultantes da amostra PGLI-M ou PGLTB-M assim como os provenientes da condição controle foram analisados em triplicatas biológicas e técnicas. Após a avaliação da qualidade dos 27 cromatogramas e espectros obtidos, os dados foram analisados usando o programa PatternLab 4.0.0.13, como descrito na metodologia. A lista de proteínas identificadas foi composta por um total de 1225 e 828 para PGLI-M e PGLTB-M respectivamente. Utilizando os parâmetros de filtragem descritos na metodologia, este número foi reduzido para 868 e 721 proteínas totais de PGLI-M e PGLTB-M respectivamente (Anexos tabela 1 e 2). Na amostra controle negativo identificamos 40 proteínas que se ligaram inespecificamente a estas partículas e estão apresentadas na tabela 3 em anexo.

A comparação entre as proteínas totais identificadas nas amostras PGLI-M e PGLTB-M mostra através do diagrama de Venn na Figura 43 que 30% (306) e 15,5% (159) das proteínas identificadas são exclusivas em PGLI-M e PGL-TB-M respectivamente, 54,5% (562) das proteínas foram identificadas como comuns.

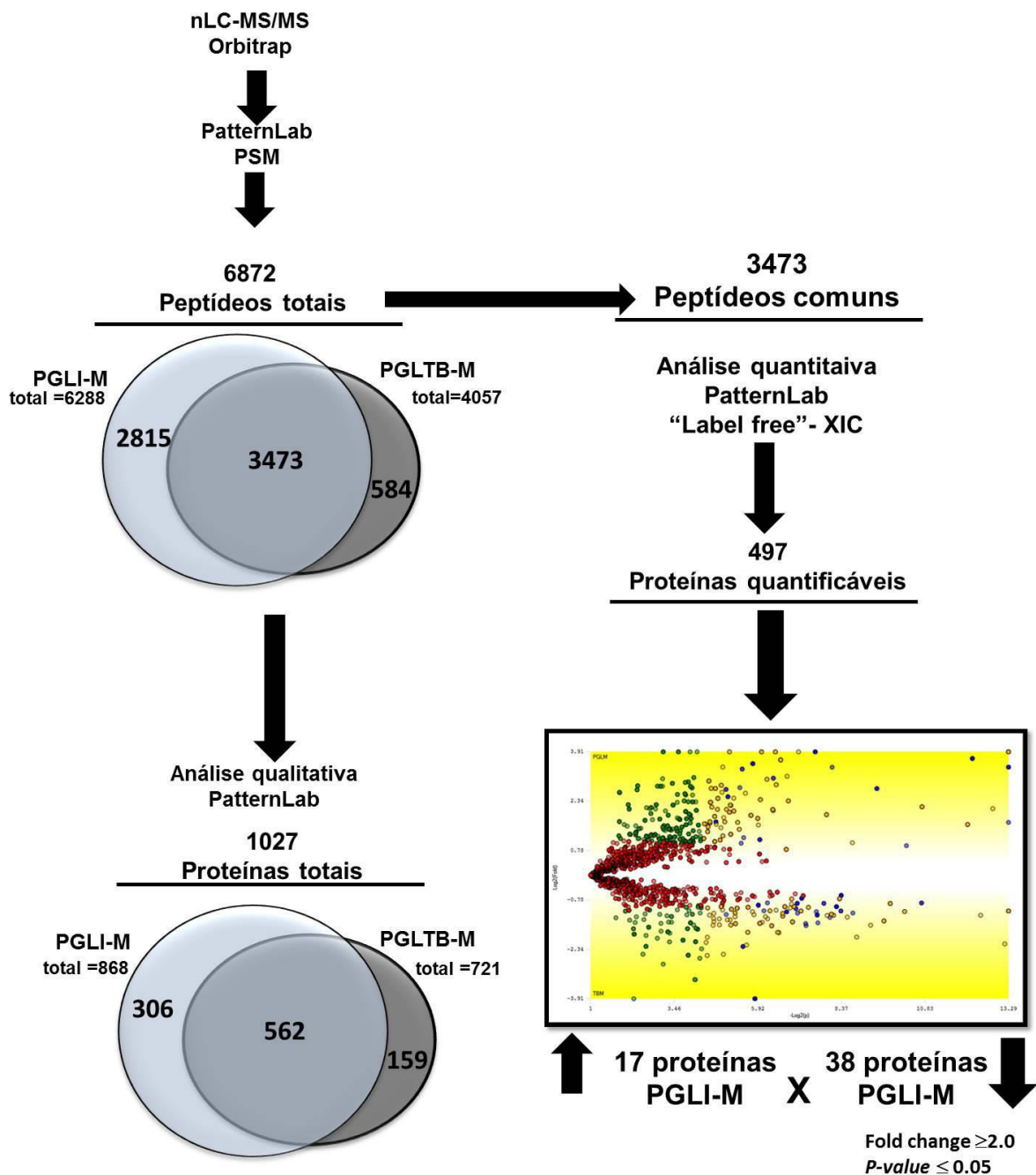


Figura 43. Diagramas de Venn comparando em número os peptídeos e proteínas identificados por MS/MS provenientes da interação entre “beads”-PGL I e PGL TB com extrato proteico enriquecido em proteínas de membranas das CS. Primeiro diagrama mostra a distribuição dos peptídeos totais identificados, seguido da distribuição das proteínas totais identificadas. Não foram contabilizadas proteínas com contagem espectral =1. Na análise quantitativa as proteínas quantificadas por XIC foram analisadas por “TFold” comparando o perfil de proteínas comuns em dois ou mais replicatas biológicas dos ligantes de PGLI-M versus ligantes de PGLTB-M. Cada proteína é mapeada no gráfico como um círculo de acordo ao seu $-\text{Log}_2$ (valor-p) (eixo x) e Log_2 (“Fold change”) (eixo y). Os círculos vermelhos representam proteínas que não satisfazem nem o cutoff do fold-change nem o cutoff $\alpha = 0,05$ do FDR. Os círculos verdes representam aqueles que satisfazem o cutoff do fold-change mas não o α . Os círculos laranja representam as que satisfazem ambos parâmetros mas são proteínas de baixa abundância e que provavelmente tenham uma quantificação comprometida. Finalmente, os círculos azuis representam os que satisfazem todos os filtros estatísticos. FDR=false discovery rate .

Foram feitas em paralelo análises quantitativas “label free” a partir dos peptídeos totais gerados inicialmente. Utilizando o método XIC do mesmo programa, das 562 proteínas comuns identificadas, 497 foram passíveis de quantificação por este método, pois atingiram os parâmetros necessários e descritos na metodologia. Em seguida foi feito um gráfico de dispersão das proteínas comuns utilizando o módulo “Tfold” do programa PatternLab afim de detectar as proteínas mais ou menos abundantes nas amostras analisadas. O resultado mostra que 3,5% (17) e 7,5% (38) das proteínas comuns identificadas foram mais ou menos abundantes respectivamente na amostra PGLI-M e que 89% destas proteínas não exibiu diferença significativa. Consideramos para esta análise as proteínas que tiveram um “fold change” ≥ 2 e $p\text{-value} \leq 0,05$. A figura 43 resume as informações quantitativas descritas neste tópico.

Foi feita uma classificação geral das proteínas totais identificadas usando o banco de dados Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) aplicando como ferramenta o Gene Ontology Explorer (Goex) da plataforma PatternLab e foram categorizadas em: processo biológico (Figura 44) componente celular (Figura 45) e função molecular (Figura 46). Estas figuras mostram apenas as classificações das proteínas correspondentes a PGLI-M visto que o perfil para PGLTB-M foi altamente similar. Para todas as 3 categorias representamos as diferentes classificações com percentual superior a 2%, sendo as classificações com percentual inferior agrupadas como outras e não foram representadas nos gráficos.

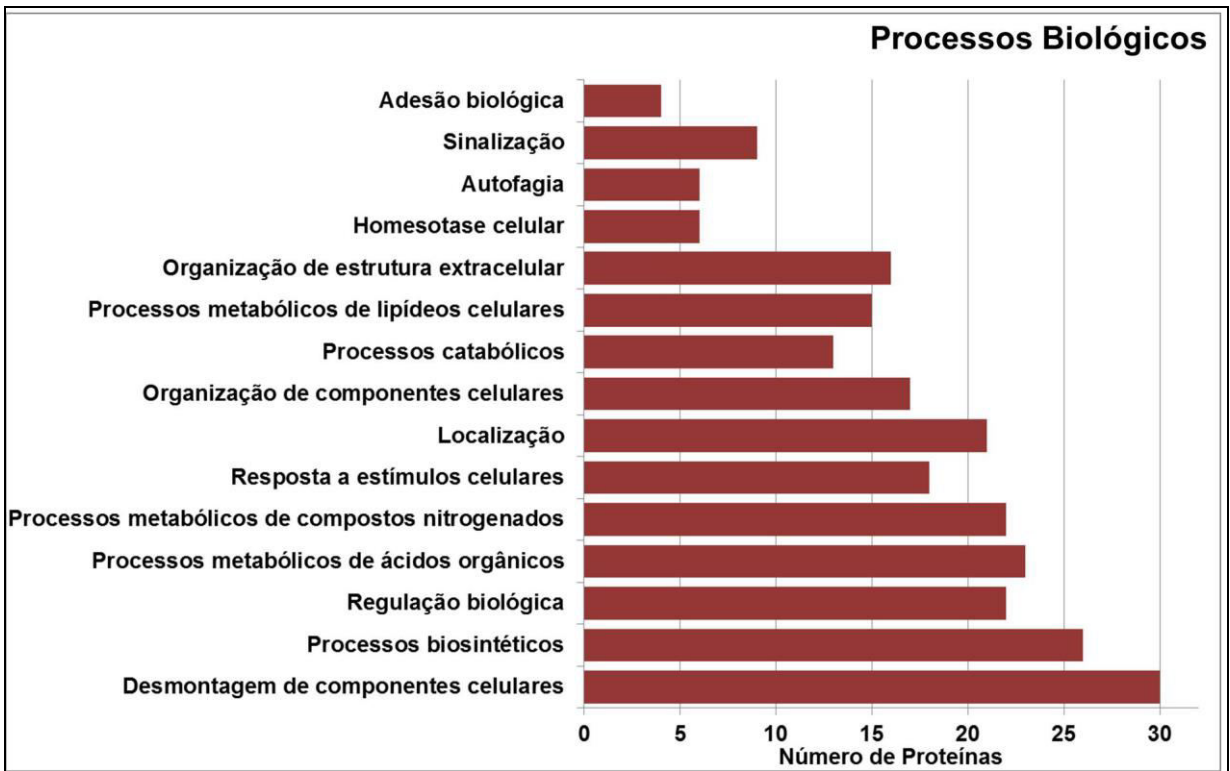


Figura 44. Processos Biológicos associados as proteínas totais identificadas na amostra de PGLI-M.

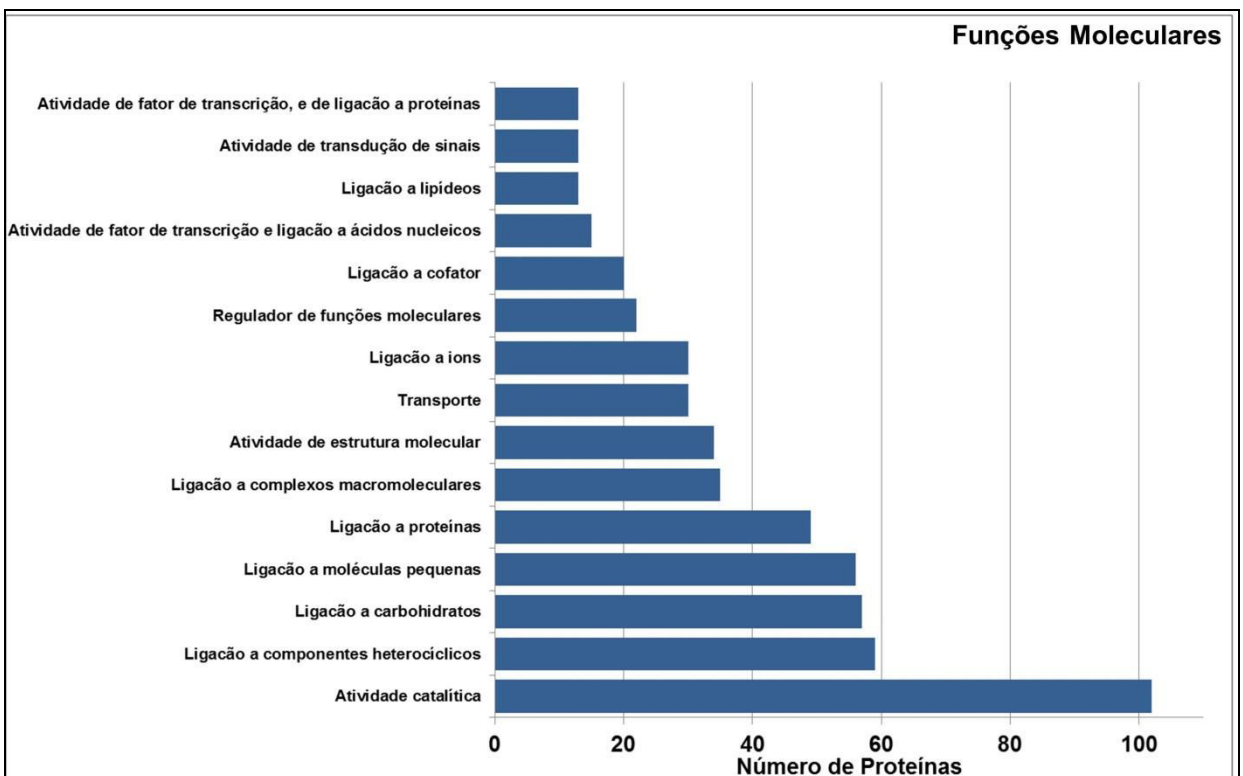


Figura 45. Funções moleculares associadas as proteínas totais identificadas na amostra de PGLI-M.

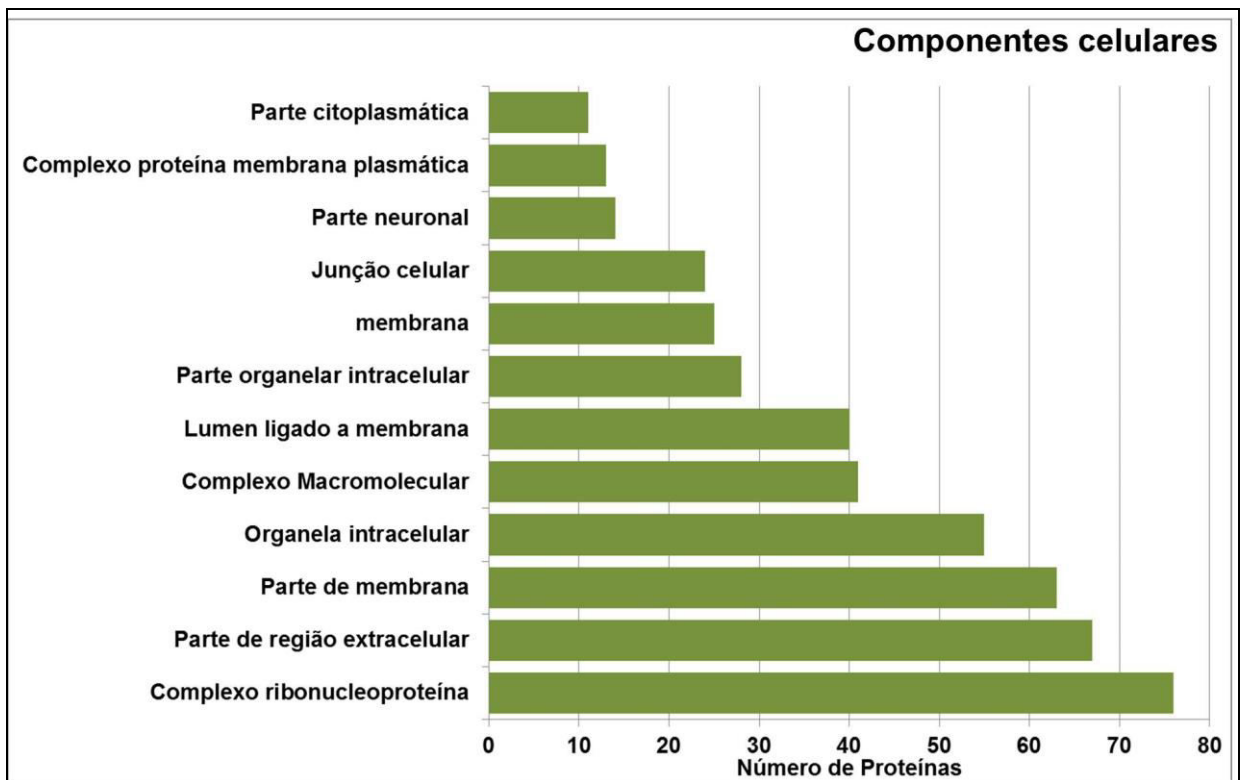


Figura 46. Componentes celulares associados as proteínas totais identificadas na amostra de PGLI-M.

5.9.3 Análise funcional preliminar dos dados proteômicos. Análise das proteínas totais identificadas na amostra PGLI-M.

Iniciamos estas análises nos concentrando nas proteínas totais identificadas na amostra PGLI-M, em uma primeira abordagem, utilizamos o programa String v.10 para criarmos uma rede de interação de todas as proteínas identificadas. Por um lado, esta análise resultou numa rede altamente complexa e interconectada (Figura 47). Por outro lado, este programa permite enriquecer esta rede de interação em processos biológicos, funções moleculares ou compartimentos celulares com base no KEGG, GO e Pathway Interaction Database. Nesta parte do trabalho nos baseamos nos dados gerados por este programa com o objetivo de integrarmos um pouco esta gama de informações.

Considerando que este projeto tem como foco o papel do PGLI na adesão e internalização em CS e com o intuito de compreender um pouco melhor o processo de invasão de *M. leprae* na CS iniciamos nossas análises focando nas proteínas totais identificadas na amostra PGLI-M. A tabela com os processos biológicos

associadas às proteínas identificadas se encontra em anexo (Anexo tabela 4). Dentro desta análise o processo celular mais destacado foi o de vias metabólicas. A tabela detalhando as vias metabólicas e de sinalização se encontram em anexo (Anexo tabela 5 e 6).

A partir da rede de interação de proteínas totais de PGLI-M (Figura 47 A) foi feito um enriquecimento em alguns processos biológicos para gerar duas redes separadas. Um dos processos selecionados foi o de proteínas associadas à matriz-extracelular e receptores (Figura 47 B), a outra rede agrupou transporte mediado por vesícula, maturação do fagossoma e endocitose mediada pela clatrina (Figura 47 C). A definição funcional de cada proteína está descrita na tabela 7 em anexo. Observamos adicionalmente que algumas destas proteínas não foram identificadas na amostra PGLTB-M (Anexo tabela 2).

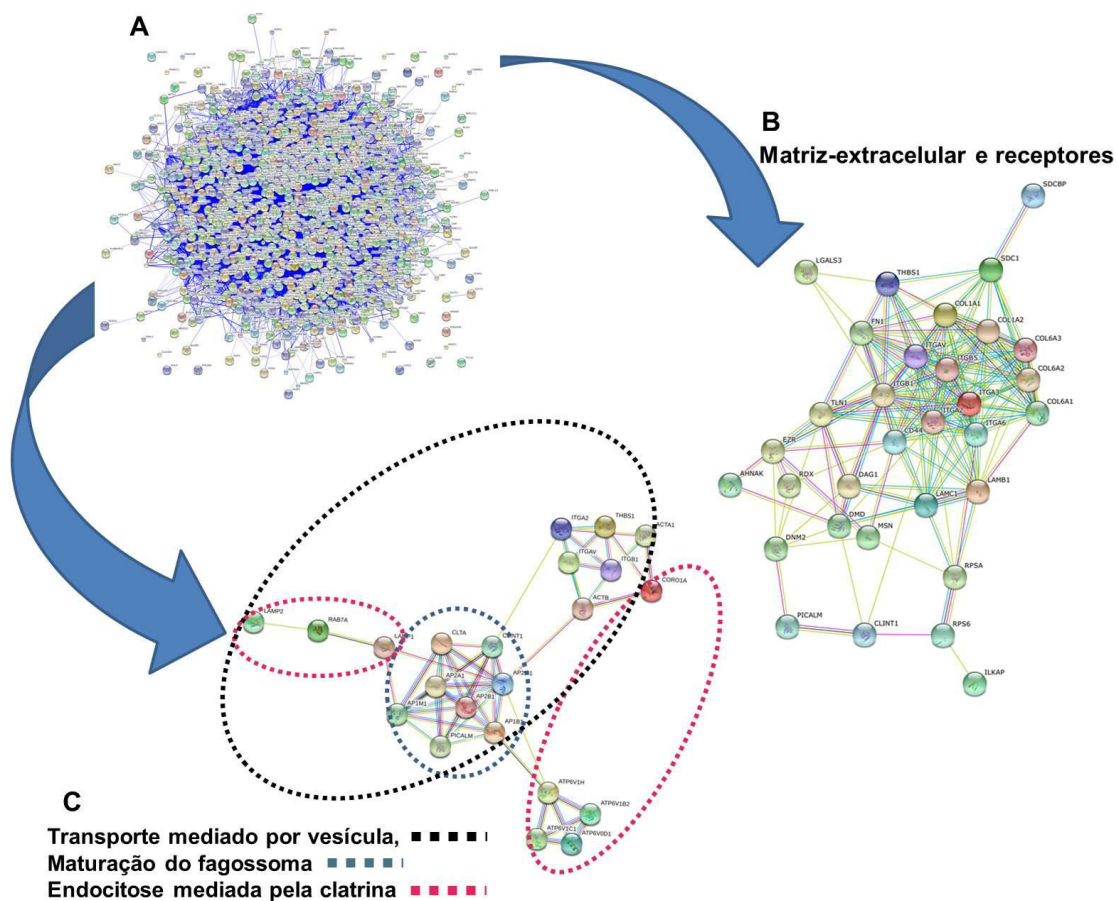


Figura 47. Rede de interação de proteínas de PGLI-M, ligantes diretos ou indiretos envolvidos no processo “Transporte mediado por vesícula”. Software: Sting v10.0. Cada nodo representa uma proteína com sua identificação e permite o acesso a informação sobre a proteína. Os nodos de maior tamanho representam as proteínas que têm informação de estrutura 3D. Os nodos são coloridos quando representam as proteínas inseridas para a busca. Os nodos são brancos quando requer vários ciclos de iteração para determinar a interação. As linhas mais grossas representam associações mais fortes. As linhas são interativas e permitem o acesso à informação do tipo de interação.

5.9.4 Análise Comparativa PGLI-M x PGLTB-M Abordagem qualitativa.

Em um segundo momento foi analisado o grupo de proteínas identificadas apenas em PGLI-M e PGLI-TB. As tabelas 8 e 9 em anexo mostram as proteínas identificadas em cada condição. Para avaliar se existia uma diferença com relação à classificação destas proteínas, foi feita uma análise geral e preliminar de acordo com os processos biológicos (Figura 48), funções moleculares (Figura 49) e componente celular (Figura 50).

Processo biológico	PGL-M			PGLTB-M		
	N° de proteínas.	% (306 total)	% (188 total)	N° de proteínas.	% (159 total)	% (98 total)
Processos metabólicos de substâncias orgânicas	125	41,0	66,5	58	36,5	59,2
Processos celulares de organismos simples	27	9,0	14,4	17	10,7	17,3
Regulação biológica	16	5,0	8,5	14	8,8	14,3
Localização celular	10	3,0	5,3	4	2,5	4,1
Processos metabólicos celulares	4	1,0	2,1	3	1,9	3,1
Biogênese ou organização de componente celular	5	2,0	2,7	1	0,6	1,0
Resposta a estímulos	1	0,3	0,5	1	0,6	1,0
Outras	119	39	x	61	38,4	X

Processos biológicos

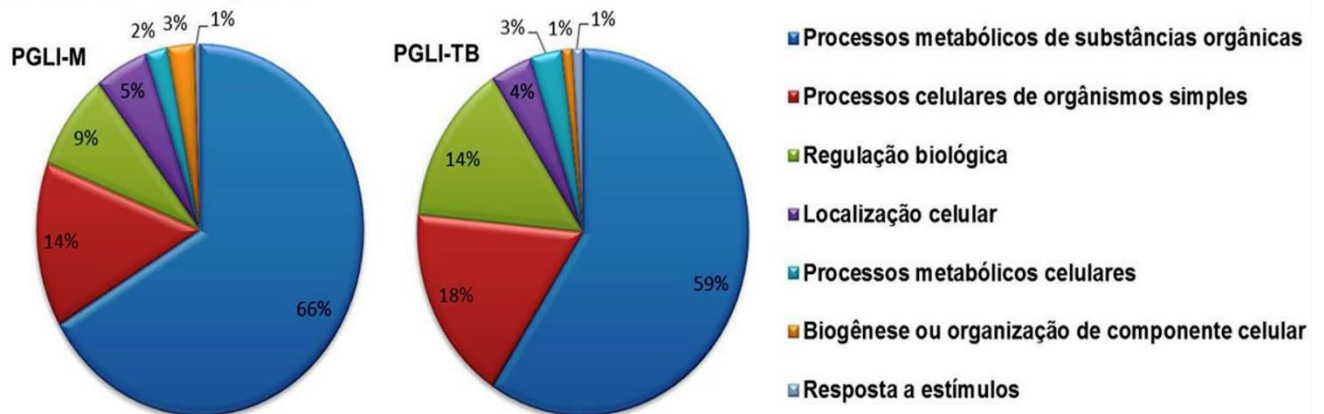


Figura 48. Análise comparativa das proteínas identificadas apenas em PGLI-M e PGLTB-M segundo classificação baseada em processos biológicos envolvidos. A tabela mostra o número de proteínas em cada processo (1ª e 4ª colunas), o percentual de distribuição das proteínas considerando as proteínas totais identificadas em cada condição (2ª e 5ª colunas) e o percentual de proteínas desconsiderando as proteínas classificadas em outros processos biológicos (3ª e 6ª colunas) estes números estão representados nos gráficos de pizza.

Função Molecular	PGLI-M			PGLTB-M		
	Nº de proteínas	% (306 total)	% (193 total)	Nº de proteínas	% (159 total)	% (98 total)
Ligação a compostos cíclicos orgânicos	100	32,7	51,8	50	31,4	51,0
Atividade catalítica	49	16,0	25,4	29	18,2	29,6
Ligação a proteína	17	5,6	8,8	9	5,7	9,2
Regulador funcional molecular	3	1,0	1,6	3	1,9	3,1
Atividade transdutora molecular	3	1,0	1,6	3	1,9	3,1
Atividade transportadora	6	2,0	3,1	2	1,3	2,0
Ligação a lipídeo	1	0,3	0,5	2	1,3	2,0
Ligação a íon	13	4,2	6,7	0	0,0	0,0
Atividade molecular estrutural	1	0,3	0,5	0	0,0	0,0
Outras	113	36,9	X	61	38,4	X

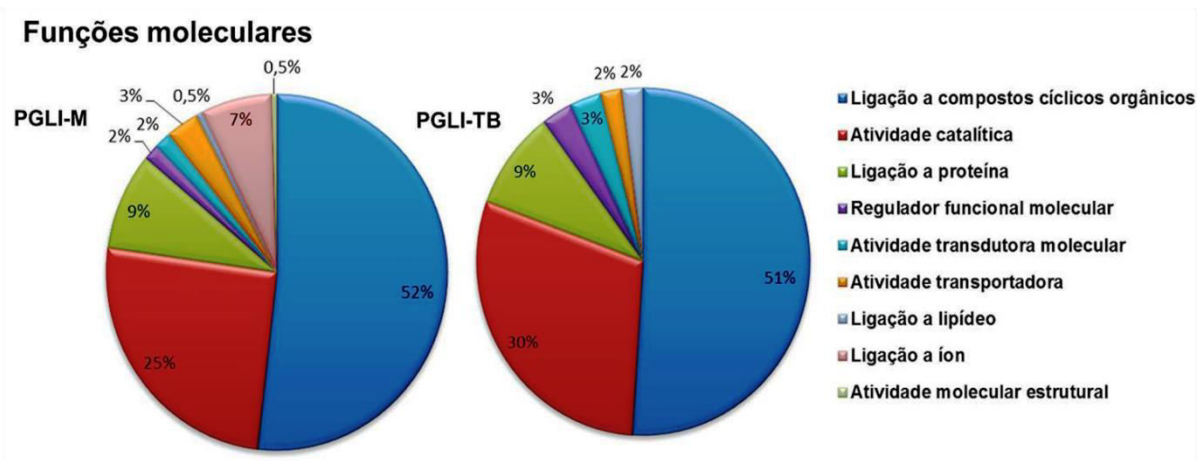


Figura 49. Análise comparativa das proteínas identificadas apenas em PGLI e PGLTB segundo classificação baseada na funções moleculares envolvidas. A tabela mostra o número de proteínas em cada função (1ª e 4ª colunas), o percentual de distribuição das proteínas considerando as proteínas totais identificadas em cada condição (2ª e 5ª colunas) e o percentual de proteínas desconsiderando as proteínas classificadas em outros processos biológicos (3ª e 6ª colunas) estes números estão representados no gráfico de pizza.

Componente celular	PGLI-M			PGLTB-M		
	N° de proteínas	% (306 total)	% (183 total)	N° de proteínas	% (159 total)	% (77 total)
Parte citoplasmática	122	39,9	66,7	62	39,0	80,5
Organelas	48	15,7	26,2	10	6,3	13,0
Complexo macromolecular	5	1,6	2,7	3	1,9	3,9
Parte membranária	7	2,3	3,8	1	0,6	1,3
Projeção celular	0	0,0	0,0	1	0,6	1,3
Parte região extracelular	1	0,3	0,5	0	0,0	0,0
Outras	123	40,2	X	82	51,6	X

Componente celular

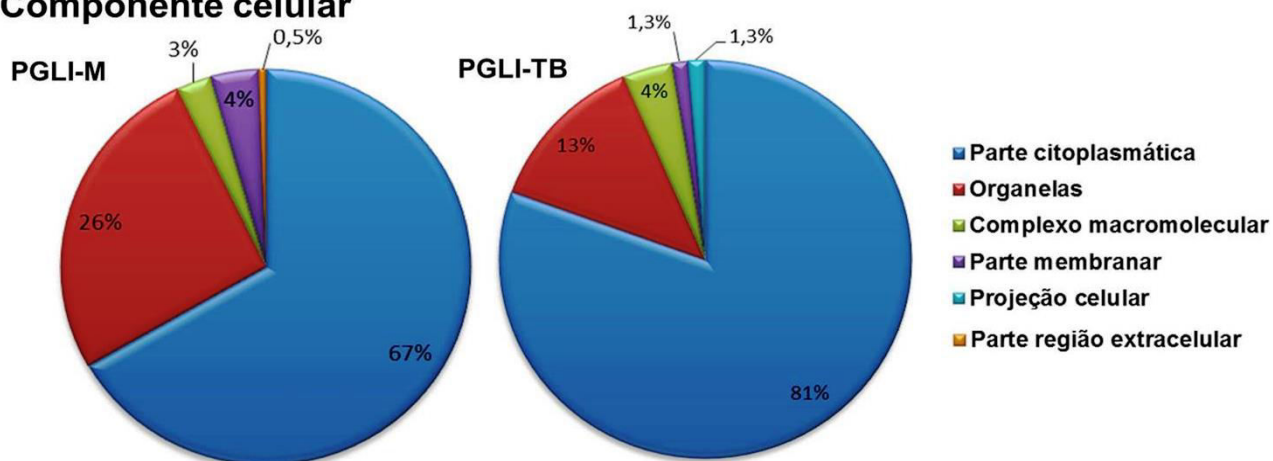


Figura 50. Análise comparativa das proteínas identificadas apenas em PGLI e PGLTB segundo classificação baseada em componentes celulares. A tabela mostra o número de proteínas em cada componente (1ª e 4ª colunas), o percentual de distribuição das proteínas considerando as proteínas totais identificadas em cada condição (2ª e 5ª colunas) e o percentual de proteínas desconsiderando as proteínas classificadas em outros processos biológicos (3ª e 6ª colunas) estes números estão representados no gráfico de pizza.

Importante ressaltar nesta análise, que foi feito um enriquecimento em alguns processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares, o que não atendeu ao número total de proteínas de PGLI-M e PGLTB-M. O percentual deste enriquecimento se encontra nos gráficos de pizza acima. Optamos por fazer esta abordagem, devido à uma pulverização das proteínas dentro destas classificações, que levou a percentuais muito pequenos que inviabilizariam a visualização geral da organização das mesmas dentro das diferentes classificações.

Focando nas proteínas somente identificadas em PGLI-M, enriquecemos as análises em alguns processos biológicos. Selecionamos algumas redes com p-value de interação significativo ($p < 0.05$). Observamos um conjunto de proteínas relacionadas

a receptores ou ligantes de receptores (Figura 51 A) e a doenças neurodegenerativas como, doença de Parkinson, Huntington e Alzheimer (Figura 51 B). Notamos que algumas destas proteínas são comuns às doenças neurodegenerativas citadas. Além destes grupos identificamos também proteínas envolvidas em metabolismo lipídico (Figura 51 C) focamos inicialmente na via de sinalização do fator transcricional PPAR. As proteínas MED1 e MED4 (mediadores de RNA polimerase II) foram identificadas como comuns a diversos processos biológicos, dentre eles, formação do complexo co-ativador da proteína TRAP, expressão do receptor “scavenger” CD36, de perilipina e adiponectina além da formação do complexo co-ativador-mediador de PPAR γ :ácido graxo:RXRA. Ainda neste grupo de proteínas de metabolismo lipídico identificamos enzimas importantes do metabolismo do ácido araquidônico.

Proteínas envolvidas em diversas vias de sinalização foram também identificadas apenas em PGLI-M (Figura 51 D), dentre as vias de sinalização selecionamos a via de proteína quinase dependente de AMP (AMPK), a via de sinalização de fosfatidilinositol, além da via ERBB. Em anexo encontra-se também a tabela de proteínas identificadas apenas em PGLTB-M (anexo tabela 6)

A

Cod. Uniprot	Identificação	Abrev. Proteínas	Processos biológicos associados a receptores ou ligantes de receptores
Q8TAS6	Laminina, beta 1	LAMB1	União a células via receptor de alta afinidade, interage com outros componentes da matriz extracelular.
P11047	Laminina, gama 1	LAMC1	(nome antigo LAMB2); Função igual a LAMB1.
P08865	Ribosomal protein SA	RPSA	Pode funcionar como receptor de superfície celular da laminina e varios outros ligantes, incluindo proteína do prion, vírus e bactérias. Tem um papel na adesão celular à membrana basal e na consequente ativação de vias de transdução de sinais.
P07996	Trombospondina 1	THBS1	Glicoproteína adesiva que media interações célula-célula e célula-matriz. É um ligante para heparina e CD36.
H0YD13	CD44	CD44	Também conhecido como glicoproteína fagocítica 1. Se une a moesina. Ativado é capaz de induzir IGF1.
P18827	Sindecano 1	SDC1	Proteoglicano de superfície que une tanto heparin sulfato e condroitin sulfato e que liga o citoesqueleto à matriz intersticial.
Q09666	Proteína associadas a diferenciação de neuroblasto	AHNAK	Necessário para a diferenciação da célula neuronal. Interage com distroglicano e ezrin, AKT1, S100B, CDKNZA, XRCCA.
P06756	Integrina, alfa V	ITGAV	
P17301	Integrina, alfa 2	ITGA2	Integrina alpha-2/beta-1 é um receptor para laminin, colágeno, fibronectina e E-caderina.
P26006	Integrina, alfa 3	ITGA3	Integrina alpha-3/beta-1 é um receptor para fibronectina, laminina, colágeno, trombospondina e CSPG4. Pode mediar junto com LGALS3 a estimulação via CSPG4 da migração celular.
P23229	Integrin, alfa 6	ITGA6	
P05556	Integrin, beta 1	ITGB1	receptor de fibronectina
P18084	Integrin, beta 5	ITGB5	Integrina alfa-V/beta-5 é um receptor para fibronectina.
P09382	Galectina.	LGALS1	Lectina que liga beta galactose e carboidratos complexos. Tem um papel em apoptose, proliferação celular e diferenciação.
Q86TYS	Galectina.	LGALS3	Lectina que liga IgE. Interage com integrina alfa 3, beta 1. Envolvida na resposta inflamatória aguda.
Q07021	Proteína que liga o componente 1 Q do complemento.	CIQB1	Ace como receptor de proteínas do complemento. Acredita-se que sinaliza através de CD209/DC-SIGN, através de integrina $\alpha 4\beta 1$ ou integrina $\beta 1$. Participa da inibição da resposta imune inata via PI3K-AKT/PKB.
P13987	Proteína reguladora do complemento.	CD59	Proteína inibitória do complexo MAC do complemento.
Q59FB9	Proteína que interage com TLR	TOLLIP	Componente da via de sinalização de IL1 e receptores Toll-like. Inibe a ativação via componentes microbianos. Recruta IRAK1 ao complexo do receptor IL-1. Inibe a fosforilação de IRAK1 e atividade quinase. Conecta a via de ubiquitina e a autofagia.
Q9BV61	Proteína associada ao receptor de TNF	TRAF1	Envolvido com a função mitocondrial
P58335	Receptor da toxina antrax 2.	ANTXR2	A proteína liga colágeno tipo IV e laminina, sugerindo que poderia estar envolvida na adesão com matriz extracelular.
P02786	Receptor de transferrina 1.	TFRC	Glicoproteína de membrana que medeia a endocitose de ferro. Alguns virus utilizam a via para internalização.
Q9UBG0	Receptor de manose tipo 2.	MRC2	Receptor tipo lectina que medeia a endocitose via clatrina de ligantes glicosilados e é dependente de calcio.
O15173	Receptor de progesterona associado a membrana .	PGRMC2	Liga lipídeos e hormônios esteróides.
C1PHA2	Receptor tipo irosina quinase.	KIF5B-ALK	Receptores de superfície de alta afinidade. As famílias de proteínas que pertencem a esta categoria: ErbB, FGFR, VEGFR, RET, EPH, DDR.
Q9Y2W1	Complexo mediador, subunidade 13	MED13 (THRAP)	Interage com receptor de Vitamina D3
Q15643	Proteína que interage com o receptor tireoide.	TRIP11	Liga ao receptor tireoide.
O14763	Receptor de TNF	TNFRSF10B	Sinaliza apoptose.

B

Cod. Uniprot	Identificação	Abrev. proteínas	Processos biológicos associados doenças neurodegenerativas
P07919	Complexo Citocrome b-c1 subunidade 6, mitocondrial	UQCRH	Comuns
P14406	Citocromo C oxidase subunidade 7A2, mitocondrial	COX7A2	
P24539	ATP sintase F(0) complexo subunidade B1, mitocondrial	ATP5F1	
P49821	NADH desidrogenase [ubiquinone] flavoproteína 1, mitocondrial	NDUFB1	
B4DV12	Poliubiquitina-B	UBB	Parkinson
O43464	Serina protease HTRA2, mitocondrial	HTRA2	
O14933	Ubiquitina/ISG15-enzima conjugante E2 L6	UBE2L6	
P17612	Proteína quinase dependente de cAMP, subunidade catalítica alfa	PRKACA	Alzheimer
P68036	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	UBE2L3	
P17655	Calpaina-2 subunidade catalítica	CAPN2	Huntington
C9JTK4	Componente mu 1 do AP-2 (Complexo de clatrina)	AP2M1	
O95782	Componente alfa 1 do AP-2. (Complexo de clatrina)	AP2A1	
P63010	Componente beta do AP-2. (Complexo de clatrina)	AP2B1	

Figura 51. (A, B)

C

Cod. Uniprot	Identificação	Abrev. Proteínas	Processos biológicos associados a metabolismo lipídico
B4DSK7	Peroxisome proliferator-activated receptor-binding protein	PBP	Via de sinalização de PPAR
E1NZA1	Complexo proteico que interage com PPAR ("peroxisome proliferator activated receptor).	PRIC295	
P0CG48	Poliubiquitina-C	UBC	
Q15067	Acil-coenzima A oxidase 1, Peroxisomal	ACOX1	
P22307	Proteína de transferencia de lipídeos	SCP2	
P24468	COUP fator de transcrição 2	NR2F2	Regulação transcricional de diferenciação de adipócitos
Q9NPJ6	Mediador de RNA polimerase II (unidade de transcrição 4)	MED4 *	Comuns
Q15648	Mediador de RNA polimerase II (unidade de transcrição 1)	MED1 *	
P17676	CCAAT/enhancer-binding protein beta	CEBPB	
Q15185	Prostaglandina E sintase 3	PTGES3	Metab. de ácido araquidônico
Q9H7Z7	Prostaglandina E sintase 2	PTGES2	
E7EY7	Glutation peroxidase	GPX8	

* Expressão de perilipina, adiponectina, CD36, ANGPTL4, LPL, FABP4 e PEPC1

D

Cod. Uniprot	Identificação	Abrev. proteínas	Processos biológicos associados a vias de sinalização
P30154	Serina-treonina fosfatase 2A 65 kDa subunidade A regulatória	PPP2R1B	Sinalização via AMPK
P67775	Serina-treonina fosfatase 2A 65 kDa subunidade e catalítica isoforma alfa	PPP2CA	
P61026	Proteína Rab-10 relacionada a família Ras	RAB10	
P62979	Ubiquitina-proteína 40S ribosomal S27a	RPS27A	Sinalização via Erbb
P62987	Ubiquitina- proteína 60S ribosomal L40	UBA52	
P0CG48	Poliubiquitina-C	UBC	
B4DV12	Poliubiquitina-B	UBB	
Q8NEB9	Fosfatidilinositol 3-quinase	PIK3C3	Sinalização via fosfatidilinositol
Q9NX62	Inositol monofosfatase 3	IMPAD1	
E9PAM4	Alfa -fosfatidilinositol 4-quinase	NPL2	

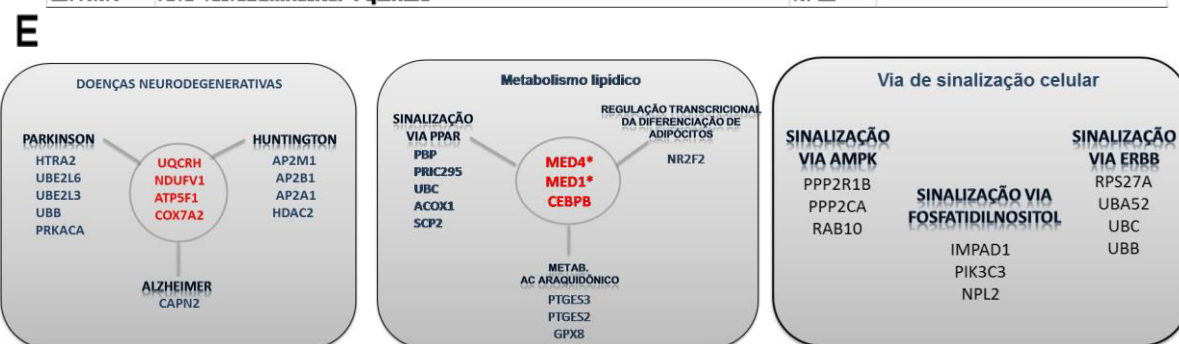


Figura 51. Ligantes diretos ou indiretos identificados em PGLI-M selecionados a partir de redes com p-value de interação significativo.

Software: Sting v10.0. Os ligantes estão envolvidos nos processos de A) Receptores ou ligantes associados a receptores B) doenças neurodegenerativas C) metabolismo lipídico e D) vias de sinalização de AMPK, Fosfatidilinositol e ERBB E) Figuras resumindo os ligantes de B, C e D.

5.9.5 Análise Comparativa PGLI-M x PGLTB-M- Abordagem quantitativa.

Além da abordagem qualitativa, analisamos quantitativamente a abundância das proteínas comuns a PGLI-M e PGLTB-M (tabela 3). Fazendo uso da ferramenta TFold analisamos a diferença quantitativa relativa entre as proteínas identificadas que ligam tanto a PGLI-M e PGLTB-M. As proteínas com “fold change” positivo estão quantitativamente mais abundantes na amostra PGLI-M quando comparada a PGLTB-M, já as com “fold change” negativo foram mais abundantes em PGLTB-M (tabela 3). As proteínas representadas que melhor satisfazem os filtros estatísticos são com “fold change” ≥ 2 e $P\text{-value} \leq 0.05$ e “cut off” de FDR=0,05.

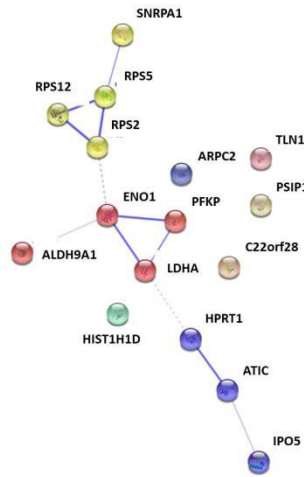
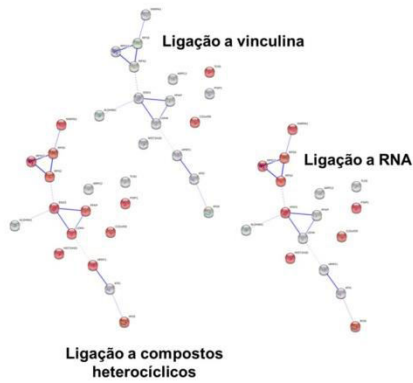
Com os dados obtidos nesta abordagem iniciamos a análise do interactoma das proteínas mais abundantes (“fold change” positivo) através do programa String e selecionamos alguns processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares a fim de visualizarmos um pouco melhor a distribuição funcional destas proteínas. Este grupo de proteínas resultou numa rede enriquecida principalmente em 3 interações ($p\text{-value} = 1,59 \text{ e-}4$) que foram agrupadas em amarelo, vermelho e azul (Figura 52). Nem todas as proteínas foram englobadas nestas redes de interação. Por exemplo, vale a pena ressaltar a proteína talina (TLN1), devido ser a proteína mais abundante na amostra PGLI-M (fold change maior) e em função de ser uma proteína relevante no contexto de internalização e endocitose que serão discutidos abaixo,

Em função do tempo e do volume de dados ainda não iniciamos as análises das proteínas menos abundantes em PGLI-M. Um aspecto interessante foi a quantidade de proteínas identificadas como potenciais ligantes de PGLI. Uma análise crítica e detalhada dos dados será extremamente necessária, mas a princípio nos parece que existem complexos proteicos que interagem com a molécula de PGLI, o que eleva o número de proteínas identificadas como ligantes deste glicolipídeo. Apesar das análises serem ainda muito preliminares, acreditamos que os dados proteômicos poderão abrir novos caminhos para o entendimento dos processos moleculares envolvidos na patogenia da hanseníase.

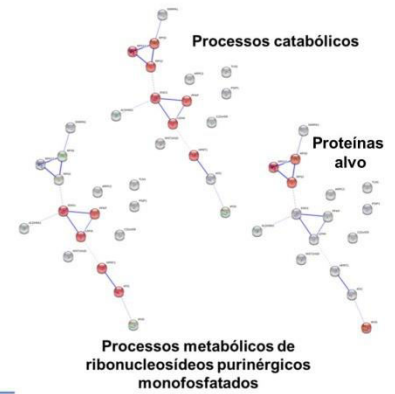
Tabela 3: Proteínas diferencialmente abundantes na amostra de PGLI-M

Cod.	Identificação (Abrev.)	Fold Change	pValue	Change(Ref PGL)
Uniprot				
Q9Y490	Talin-1 (TLN1)	4,4	0,05	Up
Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type (PFKP)	3,5	0,02	Up
O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 (ARPC2)	3,0	0,03	Up
H0Y8C6	Importin-5 (Fragment) (IPOS)	2,9	0,03	Up
Q9Y310	tRNA-splicing ligase RtcB homolog (C22orf28)	2,8	0,02	Up
P49189	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9A1)	2,8	0,01	Up
P15880	40S ribosomal protein S2 (RPS2)	2,7	0,00	Up
O75475	PC4 and SFRS1-interacting protein (PSIP1)	2,6	0,04	Up
P46782	40S ribosomal protein S5 (RPS5)	2,4	0,00	Up
P25398	40S ribosomal protein S12 (RPS12)	2,4	0,03	Up
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain (LDHA)	2,2	0,01	Up
P16402	Histone H1.3 (HIST1H1D)	2,2	0,01	Up
P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT1)	2,2	0,00	Up
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH (ATIC)	2,2	0,01	Up
Q53G21	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A' variant (Fragment) (SNRPA1)	2,1	0,03	Up
P06733	Alpha-enolase (ENO1)	2,1	0,01	Up
F6S6P2	Large proline-rich protein BAG6 (Fragment)	2,1	0,03	Up
D6RB09	40S ribosomal protein S3a (Fragment)	-2,1	0,04	Down
P14625	Endoplasmic	-2,2	0,02	Down
P35222	Catenin (Cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa, isoform CRA_a	-2,2	0,05	Down
P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	-2,7	0,02	Down
P62851	40S ribosomal protein S25	-2,8	0,04	Down
Q9NQ3	Isoform 2 of Reticulon-4	-2,9	0,05	Down
Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1	-3,1	0,05	Down
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	-3,1	0,04	Down
P26885	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	-3,2	0,02	Down
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	-3,2	0,04	Down
Q53T09	Putative uncharacterized protein XRCC5 (Fragment)	-3,2	0,03	Down
I3L3C4	Ribosomal L1 domain-containing protein 1 (Fragment)	-3,2	0,04	Down
D6RER5	Septin-11	-3,5	0,02	Down
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	-3,6	0,04	Down
Q13492	Isoform 4 of Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	-3,7	0,02	Down
B4DS66	cDNA FLJ54290, highly similar to Mitochondrial inner membrane protein	-4,2	0,01	Down
P30837	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	-4,3	0,00	Down
P07339	Cathepsin D	-4,5	0,04	Down
Q53HG7	Cortactin, isoform CRA_c	-4,6	0,03	Down
H0YD13	CD44 antigen	-5,0	0,04	Down
P61019	Ras-related protein Rab-2A	-5,1	0,01	Down
Q058U6	SFRS11 protein (Fragment)	-5,4	0,04	Down
O43143	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	-5,4	0,03	Down
B4DY09	Interleukin enhancer-binding factor 2	-5,6	0,03	Down
P13489	Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1, isoform CRA_a	-6,6	0,03	Down
O43809	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	-6,7	0,00	Down
Q10567	AP-1 complex subunit beta-1	-6,7	0,04	Down
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	-6,7	0,04	Down
P54136	Isoform Monomeric of Arginine-tRNA ligase, cytoplasmic	-7,3	0,01	Down
P19367	Hexokinase-1	-7,9	0,04	Down
Q6DEN2	DPYSL3 protein	-8,2	0,01	Down
P18031	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	-10,3	0,02	Down
Q99832	Isoform 3 of T-complex protein 1 subunit eta	-10,7	0,00	Down
O94925	Isoform 3 of Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	-10,7	0,03	Down
P16615	Isoform 2 of Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	-11,6	0,02	Down
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta	-13,0	0,00	Down
Q59EY4	CDC10 protein variant (Fragment)	-22,0	0,00	Down
J3QRD1	Fatty aldehyde dehydrogenase	-27,2	0,01	Down

Funções moleculares 81,25%



Processos biológicos 50%



Componentes celulares 75%

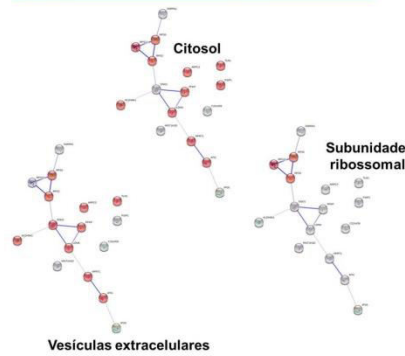


Figura 52. Rede de interação com os ligantes com fold change positivo na comparação quantitativa PGLI-M versus PGLTB-M. Software: String v 10.0.

DISCUSSÃO

M.leprae é um patógeno que serve como um bom modelo para estudar como bactérias aproveitam as funções celulares do hospedeiro. Entender a sua capacidade de infectar o sistema nervoso periférico pode ter implicações significativas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem bloquear a aderência e internalização bacteriana a unidades “célula de Schwann–axon” prevenindo o dano neural na hanseníase.

O glicolipídeo PGLI, molécula específica e abundante na superfície de *M. leprae*, constitui um importante fator de virulência deste patógeno no processo de invasão e lesão do nervo periférico (44). Atualmente é sabido que o tropismo do *M. leprae* por CS está associado com a expressão da molécula de laminina-2 na membrana destas células, e que o PGLI é capaz de se ligar a esta molécula favorecendo sua entrada na célula hospedeira (55). Rambukkana e colaboradores demonstraram que o PGLI purificado, mimetizando o efeito do bacilo inteiro, era capaz de induzir desmielinização da célula de Schwann, através da via de sinalização laminina-2-distroglicana (24,47,48). Além disto, o PGLI também está envolvido na regulação da resposta imune (44,76,77). Estes dados mostram que o PGLI é uma molécula multifuncional, envolvida em diversos fenômenos fisiológicos associados à patogênese da hanseníase, especialmente na lesão neural. Assim, os efeitos do PGLI e as bases moleculares responsáveis por esses efeitos merecem ser melhor investigados. Considerando que a infecção da CS por *M.leprae* representa o evento inicial primário desencadeante da lesão neural, resolvemos analisar neste trabalho mais detalhadamente os potenciais ligantes do PGLI e efeitos funcionais do *M. leprae* envolvendo este glicolipídeo num modelo de infecção in vitro utilizando a linhagem de CS humana ST8814 e culturas primárias. Outras micobactérias, como o BCG e o *M. smegmatis* aderem (57), mas internalizam com baixa eficiência em CSs em cultura, quando comparadas com *M. leprae* (19). Na impossibilidade de obter cepas mutantes de *M. leprae*, a cepa recombinante BCGPGLI, construída por Tabouret e colaboradores em 2010 (76), passou a representar uma excelente ferramenta para estudar o papel do PGLI como fator de virulência na interação *M. leprae*-CS.

Nossos primeiros resultados mostraram que a expressão do PGLI pelo BCG conferiu ao mesmo capacidade de infectar as CS com uma eficiência similar ao *M. leprae*, enquanto a cepa selvagem (BCGWT) e a cepa recombinante expressando PGL do *M. tuberculosis* (BCGPGLTB) não mostraram uma capacidade invasiva significativa. Conforme ilustrado na figura 6 os PGLs das micobactérias diferem entre eles na porção glicídica da molécula. Este resultado, então, apontava que o trissacarídeo específico presente no PGLI estaria envolvido na ligação da micobactéria à CS. O uso de “beads” revestidos com ND-o-BSA, uma molécula sintética que contem o dissacarídeo da extremidade não redutora do PGLI covalentemente ligado a BSA confirmou o envolvimento da porção sacarídica do PGLI no processo de internalização dos bacilos nas CSs. Beads recobertos com PGLI nativo ou ND-o-BSA internalizaram com a mesma eficiência em CS. Estes resultados estão de acordo com os dados previamente reportados por Ng e colaboradores (55) que apontaram o tricassarídeo como a porção do glicolípido responsável pela ligação aos subdomínios $\alpha 2G1$, $\alpha 2G4$ e $\alpha 2G5$ do domínio G da cadeia α da laminina 2. Nesse estudo os autores utilizaram moléculas truncadas do PGLI em ensaios de ligação em microplaca com laminina biotinizada e verificaram uma diminuição drástica de ligação quando os resíduos de açúcar eram removidos, mas não quando as cadeias de micoseratos eram removidas. Eles também observaram que não existe ligação de laminina-2 com a porção lipídica total (PDIM) do PGLI. Neste mesmo trabalho, a utilização de NT-o-BSA, molécula sintética contendo o trissacarídeo do PGLI ligado a BSA, mostrou uma eficiência de ligação à laminina de apenas 50% em relação à molécula nativa, sugerindo a participação da porção lipídica da molécula, talvez para a manutenção de uma conformação adequada e necessária para a ligação. Este resultado difere dos obtidos por nós, onde o dissacarídeo terminal do PGLI mostrou atividade de ligação e internalização na CS equivalente à molécula inteira. Essa diferença pode ser explicada pela natureza dos ensaios utilizados nestes dois trabalhos.

Um resultado muito interessante que nos chamou a atenção foi a eficiência maior de bactérias vivas de infectarem CS quando comparadas com os bacilos mortos. Tanto BCGPGLI como *M. leprae* mostraram exatamente o mesmo comportamento, os bacilos vivos apresentando uma eficiência de aproximadamente

o dobro de internalização quando uma MOI de 50:1 era utilizada. A maior eficiência de entrada da bactéria viva sugeria uma possível indução de mudanças funcionais na célula hospedeira em tempos precoces da infecção que facilitaria a entrada de mais bactérias. Estas mudanças poderiam ser disparadas, pelo menos em parte, pelo próprio PGLI, possivelmente já no interior da célula, uma vez que é sabido que o PGLI per se induz mudanças fenotípicas nas CS (24).

Esta hipótese foi confirmada com experimentos que mostraram que uma pré-infecção com *M. leprae* ou BCGPGLI permitia a internalização do BCG selvagem numa segunda “onda” de infecção em CS, e que, como esperado, este fenômeno dependia da viabilidade do bacilo. Observamos também que, diferente do tratamento com as micobactérias vivas expressando PGLI, o pré-tratamento com beads de latex recobertos com PGLI não favoreceu a internalização do BCG selvagem. De maneira interessante, o pré-estímulo com *M. leprae* ou BCGPGLI vivo não aumentou a internalização de beads de látex, nem permitiu a internalização de *M. smegmatis*, mostrando tratar-se de um processo de fagocitose seletivo e não inespecífico. Assim, concluímos que a entrada de *M. leprae* ou BCGPGLI vivo via PGLI modulam o fenótipo da CS de tal maneira que ela passa a expressar novos receptores de fagocitose com outras especificidades possibilitando a entrada do bacilo numa segunda fase por vias alternativas. A capacidade de infecção da CS dependeria numa primeira etapa da expressão do PGLI que permitiria a entrada da micobactéria. Somente a bactéria intracelular viva poderia, então, modificar o repertório de receptores de fagocitose na célula hospedeira, proporcionando a entrada de mais bactérias por outras vias, e, dessa forma, possivelmente favorecendo a infecção e persistência do bacilo.

Que outra ou outras moléculas micobacterianas e receptores celulares estariam participando nesse segundo momento da interação *M. leprae*-CS foi nossa pergunta seguinte. O fato de BCGWT, mas não *M. smegmatis* ser capaz de infectar a CS pré-infectada com *M. leprae* ou BCGPGLI, sugeria que a CS passava a expressar receptores que reconhecem moléculas do envelope celular compartilhadas entre micobactérias de crescimento lento, mas que se encontram ausentes em micobactérias de crescimento rápido. Apostamos no Man-LAM presente nas micobactérias de crescimento lento, incluindo *M. tuberculosis* (98), *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin (99), *M. avium* (92) e *M. leprae*, mas ausente no *M. smegmatis*

(100), como possível candidato devido ao seu amplo envolvimento relatado em trabalhos anteriores no processo de reconhecimento e fagocitose das micobactérias pela célula hospedeira (101). Para testar esta hipótese, Man-LAM, extraído e purificado de *M.leprae*, foi utilizado para revestir beads de látex e posteriormente incubado com a CS. Observamos que a pré-infecção com *M.leprae* ou BCGPGLI como pré-estímulo aumentou significativamente a internalização de “beads” cobertos com Man-LAM. Também, a adição de um excesso de manose no meio de cultura em ensaios de competição resultou na diminuição significativa da internalização de BCGWT em células pré-infectadas com *M.leprae* ou BCGPGLI vivo, reforçando o envolvimento de Man-LAM na segunda “onda” de infecção. Vale a pena ressaltar que a manose foi adicionada após o primeiro estímulo com os bacilos de *M. leprae* ou BCGPGLI vivos.

Os resíduos terminais de manose presentes na molécula de Man-LAM poderiam estar sendo reconhecidos por receptores celulares tipo lectinas que tem afinidade por este resíduo de açúcar. Dentre estes receptores, uma importante participação do receptor de manose 1 (CD206) através do reconhecimento de Man-LAM, tinha sido descrito no contexto da fagocitose de micobacterias por macrófagos (64,102,103). Como CS também expressam este receptor (67,68), resolvemos focar no CD206 como um possível receptor celular expresso pela CS envolvido no reconhecimento de Man-LAM na segunda “onda” de infecção. O receptor de manose é um receptor endocítico altamente eficiente que se recicla constantemente entre a membrana plasmática e o compartimento endosomal sendo majoritariamente encontrado no interior da célula (64). Observamos que micobacterias vivas expressando PGLI induzem um aumento da expressão de CD206, tanto a nível de transcrição do gene *mrc1*, como da expressão da proteína na célula infectada. Para mostrar o envolvimento direto de CD206 no fenômeno observado, ensaios de “knockdown” de CD206 foram realizados que resultaram numa redução parcial da internalização de BCGWT na presença de *M. leprae* ou BCGPGLI vivo. Isto sugere que CD206 é um dos receptores de lectina tipo C que permite a internalização de BCGWT, mas possivelmente não seria o único envolvido neste processo. Outros receptores desta família como CD209 (DC-SIGN) ou Dectin-2, que reconhecidamente ligam LAM (50,104), poderiam também estar participando deste

processo. Teles e colaboradores (50) detectaram por ensaios *in vitro* que a CS-ST8814 ou primária humana expressa CD209, e mostraram a presença deste receptor em CS presentes em lesões neurais na hanseníase. Estes autores mostraram que CD209 medeia a habilidade das CSs de ligar *M. leprae*, mas encontraram CS CD209⁻ com *M. leprae* internalizado, indicando que esta via de internalização não é essencial. Outras bactérias também parecem utilizar o CD206 para invadir CS. Um estudo recente publicado por Macedo-Ramos (68) mostrou o envolvimento do receptor de manose na internalização de *Streptococcus pneumoniae* em CS-ST8814.

Nos ensaios de “knockdown” de CD206, não observamos uma diminuição significativa da entrada do *M. leprae* ou BCGPGLI. Isto não foi o esperado, mas nos conduziu a hipóteses alternativas. Acreditamos que a entrada via PGLI é o caminho principal de internalização e que isto permite a modulação diversos de receptores endocíticos que não somente ajudam na internalização, mas também na mudança do fenótipo da célula levando a uma melhor sobrevivência intracelular do bacilo. Por exemplo, a opsonização de *M. leprae* com anticorpo CS35 anti-LAM levou a uma diminuição do grau de fagocitose do bacilo em CS (dados preliminares não mostrados). Estes dados reforçam o envolvimento de outros receptores de manose neste processo, como por exemplo, o CD209 (50). Seria interessante ainda realizar um ensaio de competição com manose para avaliar o impacto na internalização do próprio *M. leprae* ou BCGPGLI.

Por outro lado, a via de entrada pelo CD206 poderia igualmente estar favorecendo a sobrevivência do *M. leprae* na CS. Um ensaio a ser realizado ainda dentro do contexto deste trabalho seria o impacto do knockdown do receptor de manose na viabilidade do *M. leprae*. A internalização de bactérias patogênicas via receptor de manose desvia a resposta micobacteriana nos macrófagos, através da interferência com a sinalização mediada por TLR (101,105).

Alves e colaboradores (2004) observaram que *M. leprae* vivo é capaz de inibir a maturação do fagossoma em CS-ST8814 e macrófagos murinos. De acordo com a literatura existe uma relação entre a expressão de CD206 e um fenótipo menos bactericida. *In vitro*, a expressão do receptor de manose se encontra aumentado em macrófagos com ativação alternativa (M2). A ativação tipo M2, como nos casos dos macrófagos tratados com IL-4, IL-13, e IL-10 ou glucocorticoides leva a um aumento

da expressão de CD206, enquanto que IFN- γ e LPS têm um efeito negativo no receptor (106). CD206 é de fato considerado como um bom marcador de ativação alternativa de macrófagos humanos ou murinos (66,103,107). Esta ativação alternativa se refere principalmente à falta de um programa pro-inflamatório e microbicida tipicamente observado nos macrófagos M1. A ligação a CD206 de fato leva a uma atividade imunossupressora pela estimulação da liberação de citocinas anti-inflamatórias (105) e inibição de citocinas pro inflamatória IL-12 (108) e ROS (109). A entrada de *M. tuberculosis* pelo CD206 leva à formação de um fagossoma que mostra uma taxa de fusão fagolissossomal baixa (110). Este fagossoma não acidifica porque não adquire todas as subunidades da H⁺-ATPase vacuolar (110,). De fato, Kang e colaboradores (106) observaram que a ligação de Man-LAM a CD206 leva ao bloqueio da maturação do fagosoma em macrófagos. A ativação de CD206 por *M. tuberculosis* leva também à indução de PPAR γ (102) que já foi associado à inibição de uma resposta pro-inflamatória robusta. Estes macrófagos têm um fenótipo com secreção de citocinas anti-inflamatórias e produção de PGE2 (107).

Montoya e colaboradores (108) descreveram a existência de uma divergência nos programas fagocíticos e antimicrobianos de macrófagos correlacionado com a resposta do hospedeiro na hanseníase. Um fenótipo fagocítico induzido por IL10 é evidente em lesões de pacientes do polo LL, onde se observa a fagocitose aumentada de LDL oxidada e micobactérias, sem a possibilidade de disparar a via anti microbiana dependente de vitamin D, conduzindo a um ambiente intracelular favorável para o bacilo. A internalização coordenada de LDL oxidados e micobactérias pode inclusive contribuir à persistência do bacilo e à infecção crônica (109). Adicionalmente, estes lipídeos são capazes de diminuir a resposta immune contra a bactéria reduzindo a resposta antimicrobiana sinalizada via TLR e criando um desbalanço favorecendo a produção de IL10 (16). Vale ressaltar que além da expressão de CD206, macrófagos estimulados com IL-10 se caracterizam por uma expressão elevada de CD209 e de receptores “scavenger” (CD163, SR-A, CD36, MARCO), associando, assim, este tipo de macrófagos também com um perfil aumentado de incorporação de lipídeos, lipoproteínas etc (16,17).

Os dados da literatura e os nossos resultados coletivamente sugerem que as CS poderiam estar sofrendo uma reprogramação semelhante aos macrófagos com ativação alternativa. Neste contexto uma perspectiva deste projeto é repetir os

ensaios de “knockdown” de CD206 monitorando agora o seu impacto na viabilidade da bactéria.

Uma outra possibilidade muito interessante emerge com a recente descoberta da expressão do micro RNA (miR) 511-3p inserido dentro do gene *mcr1* humano e murino (64). Um aumento da transcrição do gene para CD206 também leva a um aumento do miRNA 511-3p, sugerindo a possibilidade de um efeito simultâneo destes dois fatores na mudança fenotípica da CS infectada pelo *M. leprae*. miR-511-3p, um miRNA intrônico, é a fita ativa do miR-511. Este miRNA se encontra regulado positivamente em macrófagos com ativação alternativa (107). miR-511-3p regula a expressão de uma gama de genes envolvidos em múltiplos processos celulares, incluindo morfogênese, metabolismo (por exemplo, os genes *igfr1*, e o coativador 1α de $\text{ppar}\gamma$), localização de proteínas e transcrição gênica (107). Heinsbroek e colaboradores em 2015 estudaram a contribuição do CD206 e do miR511-3p na inflamação intestinal característica da doença de Crohn e observaram que o bloqueio com anticorpo ou o uso de antagonista de CD206 não modificou o fenótipo, enquanto que a modulação do miR-511-3p teve um impacto no processo inflamatório (111). Sendo assim, o miRNA-511 necessita ser considerado quando se interpretam os resultados que envolvem o receptor de manose e tais estudos deveriam ser realizados para explorar o impacto deste miRNA na patogenia da hanseníase. Estudos que tenham como alvo o receptor de manose e o miR-511 certamente poderão ter aplicações no tratamento da hanseníase e além.

Numa etapa seguinte do trabalho mostramos o envolvimento de $\text{PPAR}\gamma$ na expressão de CD206 induzida por *M. leprae* e BCGPGLI vivos na CS. Isto foi conseguido através do uso do antagonista do receptor GW9662, associado à observação de que o fator era induzido pela infecção. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura mostrando o papel de $\text{PPAR}\gamma$ na indução de CD206 por IL-13 (106, 112). Igualmente, vários trabalhos já haviam mostrado a capacidade de micobactérias de crescimento lento de induzir $\text{PPAR}\gamma$ em macrófagos (96,113). Também observamos que a secreção de IL-8 induzida pelo *M. leprae* em SCs é dependente da via de $\text{PPAR}\gamma$ e do receptor de manose. Estes achados estão em concordância com a literatura que indica que a região promotora do gene que codifica a IL-8 apresenta um elemento de resposta a $\text{PPAR}\gamma$ (114). Oliveira e

colaboradores (49) já haviam descrito a secreção de IL-8 por CS tratadas com uma lipoproteína de *M.leprae* ligante de TLR2. Rajaram e colaboradores (112) observaram que a infecção por BCG leva a um perfil de expressão mais limitado de PPAR γ que a infecção por *M. tuberculosis* em macrófagos humanos. Eles determinaram que NF-kB medeia a produção de IL-8 após infecção de BCG , enquanto PPAR γ medeia a produção de IL-8 após infecção por *M. tuberculosis* H37Rv ou estimulação por ManLAM. *M. leprae* parece mediar a produção de IL-8 via PPAR γ . Considerando que *M. leprae* induz a formação de corpúsculos lipídicos de forma independente de TLR2 (18) e a via ativação de PPAR γ , que por sua vez causa transrepressão de NFkb, então a produção de IL-8 em CS infectadas com *M. leprae* poderia estar de fato sendo regulado por PPAR γ e de forma indireta por CD206. IL-8 é uma citocina pro-inflamatória que foi associada a demielinização de nervo e neurodegeneração (115). Talvez a secreção desta citocina esteja envolvida nos processos agudos de neuropatia observados na hanseníase.

Os mecanismos de ação dos “PPARs” são atualmente importantes alvos de estudo. Sabe-se que os “PPARs” são proteínas que pertencem à superfamília de receptores nucleares (116 120). Atualmente se conhece a existência de três isoformas; PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ . PPAR γ é o membro que é ativado por lipídeos. Eles podem ser ativados por fatores endógenos, como prostaglandinas ou ácidos graxos, ou exógenos, como drogas, e após ativação iniciam a transcrição de uma série de genes alvos que estão envolvidos no metabolismo. PPAR γ age como fator de transcrição formando heterodímero com o receptor RXR (“retinoid X receptor”) e união a elementos responsivos específicos de PPAR nas regiões promotoras dos genes alvos (116). Na ausência de ligantes, PPAR γ interage com um complexo repressor que se encontra deacilado e isto inibe a transcrição de genes. A união de ligantes leva à heterodimerização com RXR e o recrutamento do coativador que exerce uma função de acetilase de histona.

Estudos apontam que PPAR γ se encontra altamente expresso em macrófagos espumosos e contribui para o acúmulo de lipídios nessas células (18,96,112,113,117). Dados da literatura também mostram que a ativação de PPAR γ leva à ativação alternativa de macrófagos (M2) com propriedades anti-inflamatórias (118, 119). A presença de macrófagos e CS com aspecto espumoso e altamente

infectados com *M.leprae* é uma característica diferencial da hanseníase lepromatosa. O aspecto espumoso se atribui aos corpúsculos lipídicos presentes no citoplasma destas células (120, 121). Além do seu provável envolvimento na regulação de CD206, PPAR γ é um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos, acúmulo de lipídeos e resposta inflamatória (81,119). Já foi demonstrado que o PPAR γ participa, por exemplo, da indução de *adrp*, CD36 e COX2. Como *M. leprae* é capaz de estimular a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos e CS (18,79,121), avaliamos numa etapa seguinte a participação deste fator de transcrição nesta indução. Considerando a especificidade e importância biológica da molécula de PGLI resolvemos também avaliar se este glicolípido estaria envolvido neste processo utilizando as cepas de BCG recombinante.

Nossos dados mostram que além do BCGPGLI exibir uma maior capacidade invasiva foi também capaz de induzir CLs em CS e monócitos primários humanos (hMDM) (dado não mostrado) em um nível similar ao *M. leprae*. Este resultado não foi evidenciado quando infectamos as CS com as cepas de BCGWT e BCGPGLTB possivelmente pelo fato destas cepas não serem capazes de invadir as CS de forma eficaz. Adicionalmente vimos, em concordância com o observado na infecção pelo *M. leprae* (19), que apenas BCGPGLI viável induziu a formação de CL em CS. Isto significa que em CS a indução de CLs depende da internalização e viabilidade celular. Mattos e colaboradores (53) mostraram que a adição de PGLI ao meio de cultura, assim como LAM, Man-LAM e LPS não induziram a biogênese de CLs em CS. Todavia, o resultado de que apenas o BCGPGLI dentre as cepas recombinantes de BCG era capaz de induzir a biogênese destas organelas, nos levou a acreditar que o PGLI poderia estar envolvido neste fenômeno. Portanto, para confirmar esta hipótese “beads” de látex foram recobertos com PGLI. Após a estimulação das CS e hMDM por 48 horas com estas partículas, verificamos a indução da formação destas organelas lipídicas. Como visto anteriormente, tanto as “beads” *per se* quanto “beads” PGLI foram internalizadas pela CS, esta última muito mais eficientemente. Entretanto, apenas “beads” PGLI induziram CLs. Logo, apesar da internalização ser importante, a presença do PGLI foi determinante para a biogênese de CLs. O aumento da expressão do gene *adrp*, um marcador de CL, nas células infectadas com *M. leprae* ou BCGPGLI ou nas células tratadas com “beads”-PGLI confirmou

estes resultados. É importante ressaltar que, comparativamente com o BCGPGLI, os níveis de CLs foram inferiores na célula tratada com “beads”-PGLI, o que sugere que outros fatores/vias também estejam envolvidos neste processo. Um ponto relevante com relação à molécula de PGLI é o fato de que a porção lipídica da molécula parece ter um papel na formação dos CLs nas CS. Isto foi constatado devido à porção glicídica (ND-o-BSA) *per se* não ter sido capaz de induzir estas organelas lipídicas.

Considerando que a internalização é um fenômeno importante para a formação dos CLs, a pergunta seguinte foi verificar se o BCGWT, uma vez internalizado, conseguiria induzir a biogênese de organelas lipídicas. Os ensaios de co-infecção mostraram que a internalização do BCGWT nas CS não levou à indução de CLs. Isto reforça a participação direta do PGLI na indução de CLs e sua importância na sobrevivência e persistência de *M. leprae* em células de Schwann.

Numa etapa seguinte, verificamos que o pré-tratamento com o antagonista de PPAR γ bloqueou a indução de CLs, assim como a expressão de *adrp*, após a infecção com os bacilos vivos expressando PGLI ou estímulo com “beads” PGLI. Estes resultados sugerem fortemente que a infecção de CS pelo *M. leprae* ou BCGPGLI induz a biogênese de CLs via PPAR γ e que o PGLI contribui de alguma maneira neste processo. Também nossos resultados mostraram uma regulação positiva do gene que codifica CD36 em CS infectadas com *M. leprae* e BCGPGLI viáveis ou estimuladas com “beads” PGLI. Estes achados são consistentes com a observação de que os genes para ADRP e CD36 se encontram regulados positivamente em lesões LL, ricos em macrófagos com acúmulos de CLs (16,18,120,121) e são induzidos *in vitro* em células infectadas com *M. leprae* (18). De acordo com a literatura, o papel de CD36 vai além de receptor scavenger. Ele também tem um papel na fagocitose de microorganismos como, por exemplo, *Plasmodium falciparum* (122) ou *M. tuberculosis* (123). Almeida e colaboradores (2014) sugerem que uma colaboração CD36-TLR2 e a compartimentalização de sinalização via “lipid rafts”, desvia a resposta do hospedeiro via sinalização dependente de PPAR, mas independente de NF- κ B, levando a um aumento da acumulação de lipídeos nos macrófagos e diminuição da resposta do macrófago (124).

Almeida e colaboradores (96, 113) descreveram que BCG e ManLAM, são capazes de induzir a expressão de PPAR γ através de uma via dependente de TLR2. Contudo, estes mesmos autores mostraram que o bacilo não patogênico *M. smegmatis*, um conhecido ligante de TLR2, assim como Pam3Cys, um ligante sintético de TLR2, foram incapazes de induzir a expressão de PPAR γ em macrófagos, sugerindo que a expressão de PPAR γ é dependente TLR2 e de co-receptores a ele associados. No entanto, os co-receptores de TLR2 e as vias biológicas envolvidas na expressão de PPAR γ induzida por micobactérias são atualmente desconhecidas, e surge, então, a possibilidade de que o co-receptor poderia ser um receptor de lectina tipo C como o MR. Rajaram e colaboradores (112) demonstraram em macrófagos humanos que a infecção com *M. tuberculosis* ou a adição de ManLAM aumenta a expressão de PPAR γ independente de NF- κ B ou TLR2. Schreiber e colaboradores (125) reportaram que a biossíntese do receptor de manose é ativada por prostaglandinas da série E, e estes agentes anti-inflamatórios revertem os efeitos do IFN- γ na expressão do receptor. Como no presente trabalho mostramos que o *M. leprae* vivo induz a formação de corpúsculos lipídicos em CS via ativação de PPAR γ , e uma vez que a biogênese de corpúsculos lipídicos se correlaciona com a produção aumentada de PGE2 (19), isto sugere a existência de uma regulação positiva recíproca entre CD206 e PPAR γ em CSs infectadas com *M. leprae*. Isto, de fato, parece ocorrer em macrófagos. Por um lado, Rajaram e colaboradores (112) reportaram que *M. tuberculosis per se* e componentes de parede como Man-LAM induzem a expressão de PPAR γ através de uma via dependente de CD206. Por outro lado, moléculas que indiretamente levam à ativação de PPAR γ , como, PGE2 e IL-13, dentre outros, induzem a expressão de CD206 em macrófagos murinos (95)

Dentro da patogenia de infecções micobacterianas a modulação do metabolismo lipídico representa uma característica cada vez mais evidente e importante. Dados da literatura mostram um perfil diferencial de indução de CLs entre diferentes espécies de micobactérias (120) e que a biogênese destas organelas está associada a patogenicidade micobacteriana visto que *M. bovis* (87,96,126), *M. tuberculosis* (127,128) e *M. leprae* (78, 120) são capazes de induzir CLs na célula hospedeira, enquanto espécies não patogênicas, como *M. smegmatis*,

não apresentam competência para ativarem tal fenômeno celular (96,117,126,127). Somado ao papel de diferentes espécies de micobactérias, diferentes tipos celulares também respondem de forma peculiar. Mattos e colaboradores (18,53) mostraram que os elementos indutores dos CLs em CS infectadas com *M. leprae* exibem similaridades e diferenças com os observados em macrófagos. Um aspecto similar é a dependência do tempo de infecção e do número de bacilos, isto é, quanto maior a MOI maior o número e área de CLs. No entanto nas CS, diferentemente do observado em macrófagos, a formação de CLs induzido pela infecção com *M. leprae* é dependente da fagocitose e da viabilidade dos bacilos. Outro ponto distinto entre CS e macrófagos com relação à resposta ao *M. leprae* no contexto de CLs, é o papel dos TLRs. Enquanto em macrófagos estão envolvidos tanto TLR2 quanto TLR6, nas CS a sinalização disparada pelo *M. leprae* se dá via TLR6. Nestas células TLR2 não é essencial para a biogênese de corpúsculos lipídicos (53). Um fato interessante é que em macrófagos o *M. bovis* BCG induz CLs via TLR2 e o *M. leprae* como mencionado acima envolve TLR2 e TLR6 (18,96,126), sugerindo que o *M. leprae* tem em sua composição algum antígeno diferencial reconhecido pelo receptor TLR6 que é importante no processo de biogênese de CLs.

Mattos e colaboradores (117) ainda mencionam a questão da participação de algum co-receptor, que, em conjunto com TLR6, tenha um papel importante no reconhecimento do *M. leprae* e na sinalização por ele disparada após infectar CS. Os nossos resultados sugerem que o receptor de manose pode ser um co-receptor de grande importância na sinalização de *M. leprae* vivo em CS. Os dados mostraram o envolvimento de PPAR γ na indução de corpúsculos lipídicos após infecção com *M. leprae* ou BCGPGLI vivo em CS. Observamos que estes bacilos foram capazes de induzir a expressão do receptor de manose e estabelecemos a existência de um “cross talk” entre PPAR γ e receptor de manose nas CS. Para validar ainda mais essa hipótese futuramente iremos analisar a formação de corpúsculos lipídicos em CS infectadas com BCGPGLI e *M. leprae* e tratadas com RNA de interferência para silenciar o gene do receptor de manose.

O processo de internalização e sobrevivência de *M. leprae* na CS ainda não é completamente compreendido. CS infectadas com *M. leprae* perdem a capacidade de matar o bacilo, levando a uma proliferação bacteriana dentro destas células e também no interior de macrófagos no nervo periférico (58). O PGLI é um fator de

virulência exclusivo de *M. leprae* com papel importante na entrada do bacilo na CS. Ele parece ter também um papel importante na ativação de vias de sinalização envolvidas em diferentes funções celulares e uma vez dentro da célula, na modulação de diferentes vias metabólicas favorecendo a sobrevivência intracelular do *M.leprae*. Neste contexto um objetivo deste trabalho foi identificar potenciais ligantes do PGLI na CS que poderiam estar envolvidos nos processos por ele mediados.

Entre as proteínas identificadas e processos biológicos relacionados a elas, encontramos proteínas que fazem parte da matriz extracelular e receptores de membrana que interagem com componentes da matriz extracelular. A função de enriquecimento do String nos permitiu selecionar as proteínas identificadas neste processo biológico. Considerando a nossa pergunta inicial sobre o papel do PGLI na invasão de CS e que a laminina-2 e moléculas associadas a ela já tinham sido identificadas como ligantes do PGLI, decidimos focar a discussão dos resultados preliminares obtidos entorno aos ligantes de laminina, seus receptores e proteínas da matriz extracelular identificados. Analisamos ainda a presença de componentes do complexo de Integrinas (α , β , γ) e colágenos, proteínas que interagem com fibronectina, como sindecana e o complexo Ezrin-Radixin-Moesin, que também foram identificados nesta amostra. Adicionalmente consideramos proteínas envolvidas nos processos de endocitose e fagocitose. Com esta análise, foram consideradas 31 proteínas.

A matriz extracelular consiste em uma mistura complexa de macromoléculas estruturais e funcionais. Interações específicas entre as células e a matriz extracelular (ECM) são mediadas por moléculas transmembranares, principalmente integrinas assim como proteoglicanos, CD36, ou outros componentes associados à superfície. Rambukkana e Ng (47,54,55) basearam o estudo da interação de *M. leprae* e do PGLI com a célula de Schwann na laminina-2. Assim como nos nervos periféricos *in vivo*, a laminina-2 também é expressa na lâmina basal das unidades axônio-CS de co-culturas *in vitro* de neurônios-CS mielinizantes. E a aderência de *M.leprae* nestas células também é mediada por laminin-2 *in vitro*. Eles ainda observaram a incapacidade de *M. leprae* de aderir *in situ* em nervos periféricos de camundongos distróficos *dy/dy*, que carecem de cadeia de laminina $\alpha 2$ mas

expressam normalmente as cadeias $\beta 1$ e $\gamma 1$ da laminina, reforçando a hipótese deles de que a cadeia $\alpha 2$ de laminina-2 é responsável pela interação de *M.leprae* com nervos periféricos. Adicionalmente Rambukkana e colaboradores reportaram que “beads” de latex recobertos com PGLI simulam a adesão de *M. leprae* e a invasão da lamina basal numa maneira dependente de laminina-2 (56).

Cada laminina é um heterotrímero composto de subunidades de cadeias α , β e γ . Atualmente se conhece a presença de dois tipos de laminina na lâmina basal de células de Schwann; a laminina-2 ($\alpha 2\beta 1 \gamma 1$) e laminina-8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$) (58). Com o desenho experimental aplicado neste trabalho que combinou pull down e nLC-MS/MS para a busca de ligantes (diretos ou indiretos) de PGLI em extrato de membrana de CS-ST8814 foi detectada a presença das cadeias de laminina $\beta 1$ e $\gamma 1$ mas não foi detectada a cadeia $\alpha 2$. De acordo a Rambukkana e colaboradores (56) quando células de Schwann são isolados de nervos ciáticos e mantidos como cultura primária em ausência de neurônios, as células são incapazes de secretar a cadeia $\alpha 2$ de laminina. Isto pode explicar o fato de não termos detectado a cadeia $\alpha 2$ em extrato de cultura de CS-ST8814. Existe, no entanto controvérsia neste aspecto (dados antigos não publicados do nosso grupo) e a presença ou ausência da cadeia precisa ser confirmada com outros métodos.

Os principais receptores de superfície celular para as lamininas são as integrinas e os proteoglicanos, tais como os distroglicanos e os sindecanos. De acordo a Rambukkana e colaboradores (56) a superfície de *M.leprae* também possui ligantes para α -distroglicano. No entanto, *M.leprae* somente liga α -distroglicano nativo na presença das porções globulares da laminina alfa 2 ($\alpha 2LG$). Ele observou que α -distroglicano nativo inibe competitivamente a união do complexo *M.leprae*- $\alpha 2LG$ a CS primárias que não expressam $\alpha 2LG$ em sua superfície. No entanto, o autor conclui que estes dados não excluem a possibilidade da participação de outros receptores na interação *M.leprae*-CS já que α -distroglicano foi incapaz de inibir completamente a adesão de *M.leprae* na presença de $\alpha 2LG$.

Mas então surge a pergunta: sem a cadeia $\alpha 2$, como acontece a internalização de *M. leprae* na CS-ST8814 in vitro? Ou se for via a cadeia $\alpha 2$, porque as outras micobactérias que aderem como reportado por Marques e colaboradores (57), não são internalizados com eficiência?

De acordo com a literatura os receptores de laminina do tipo não-integrina são: distroglicanos, sindecanos e o receptor 67LR ou RPSA (129,130). Os nossos resultados não mostraram a presença de distroglicano (nem alfa ou beta). Isto faz sentido se pensarmos na ausência da cadeia de laminina $\alpha 2$, a molécula necessária para a interação com α -distroglicano. Deste grupo foram detectados os receptores de laminina 67LR e o sindecano assim como seu ligante sintenina. Dado que o sítio de interação com o receptor 67LR se encontra na cadeia $\beta 1$ da laminina, podemos pensar numa interação entre estas proteínas detectadas. Vale ressaltar que somente os animais multicelulares têm membrana basal com laminina. De maneira interessante, alguns organismos patogênicos (por exemplo, *Leishmania donovani*) expressa apresentam receptores de laminina como 67LR associada a sua membrana e isto ajuda na adesão e posterior invasão da célula hospedeira. A literatura também indica que 67LR facilita a interação entre laminina e integrinas e que existe uma co-regulação da localização e interação entre 67LR e integrinas (62,131). Por outro lado 67LR já foi descrito atuando como receptor de internalização de alguns vírus, príons e bactérias (62). A utilização do receptor 67LR parece então, ser um mecanismo comum que microorganismos usam para invadir células hospedeiras.

Por outro lado, nosso estudo detectou a presença de proteínas da família das integrinas ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$). Vários membros da família integrina, incluindo heterodímeros $\alpha 1/\beta 1$; $\alpha 2/\beta 1$; $\alpha 3/\beta 1$; $\alpha 6/\beta 1$; $\alpha 7/\beta 1$ e $\alpha 6/\beta 4$ agem como receptores de laminina em diferentes tipos celulares (58). (Sublinhado os possíveis dímeros que poderiam funcionar como receptor de laminina com as cadeias identificadas no nosso estudo). Várias destas integrinas que ligam lamininas medeiam à adesão de ligantes adicionais; $\alpha 1/\beta 1$ e $\alpha 2/\beta 1$ são receptores de colágeno; enquanto receptores com $\alpha 5$ ou $\alpha 9/\beta 1$ medeiam a adesão de células à outros componentes de matriz e receptores (58). $\alpha 6/\beta 1$, $\alpha 7/\beta 1$ e $\alpha 6/\beta 4$ são consideradas exclusivamente receptores de laminina enquanto $\alpha 3/\beta 1$ é capaz de ligar múltiplos alvos como fibronectina (FN), colágeno IV (col IV) e trombospondina (THBS-1) assim como lamininas-1 e -5 (58). FN, col IV e THBS-1 foram detectados no nosso estudo. Além das integrinas o receptor scavenger CD36 é receptor de Trombospondina-1. A regulação positiva desta molécula está associada a ganho de peso, crescimento de tecido adiposo e

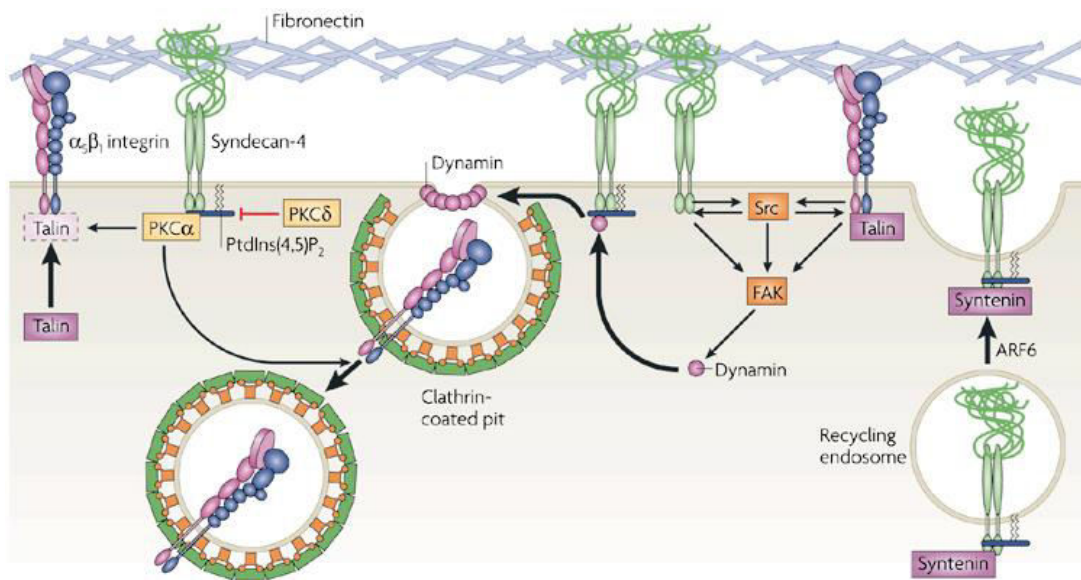
disfunção metabólica. Trombospondina 1 parece ter uma papel na estimulação da proliferação de adipocitos, resposta inflamatória e uptake de ácidos graxos (132).

A fibronectina apresenta um sitio de ligação para sindecano que a permite de agir como co-receptor para integrinas e criar uma resposta de sinalização sinérgica (58). Ng e colaboradores (55) fizeram uma prova de ligação de PGLI com proteínas de matriz. Ele observou uma união forte entre PGLI e laminina-2 mas uma união fraca com colágeno I, II, IV e fibronectina. Isto sugere que tanto a fibronectina 1 como as isoformas de colágeno que foram detectados no nosso estudo poderiam ser ligantes indiretos do PGLI. Existem relatos na literatura onde sugerem a união de *M. leprae* e outras micobactérias com fibronectina (133), mas via a proteína FAP que liga a fibronectina (FAP=FN attachment protein) e é codificada pelos bacilos.

Apesar de não termos detectado distroglicano, pudemos identificar distrofina (DMD); proteína que interage com β distroglicano e identificamos a sintenina; proteína ligante de sindecano. O sindecano é uma molécula capaz de ligar e controlar a atividade de várias moléculas de adesão e de sinalização. O sindecano da membrana plasmática é capaz de ser internalizado para o compartimento endosomal (134).

Ainda no nosso trabalho foram identificadas moléculas que conectam o espaço extracelular ou proteínas de membrana com o citoesqueleto. Uma destas moléculas é a proteína chamada talina, identificada e quantificada como mais abundante em PGLI-M quando comparada a PGLTB-M (tabela 3). Além da talina, o complexo ezrin/radixin/moesin também participa deste processo. Ezrin é capaz de interagir com distroglicano e AHNAK. Já a proteína AHNAK (“Neuroblast differentiation-associated protein”), identificada neste trabalho com 608 espectros, foi descrita como capaz de modificar a união de laminina a CS via interação com distroglicano.

A Figura 53 é ilustrativa e mostra a organização celular de algumas das proteínas identificadas neste trabalho.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 53. Ilustração de moléculas ligantes (diretos ou indiretos) de PGLI envolvidos no processo biológico de adesão e endocitose. Figura extraída de Morgan, 2007 (135).

Finalmente e ainda dentro do contexto da rede de interação estudada até o momento, foram detectados ligantes envolvidos na formação de vesículas recobertas com clatrina (anexo Tabela 4 e Figura 54). Detectamos as cadeias leves e pesadas da clatrina (CTLA, CTLC) assim como os componentes do complexo de proteínas adaptadoras AP (complexo AP) necessários para a montagem duma vesícula revestida de clatrina (136,137). Detectamos ainda moléculas como PICALM, DINAMINA, CLINT importantes para a formação ou transporte da vesícula. Este resultado pode constituir uma pista interessante para entender melhor a internalização de *M. leprae*. Na Figura 54 podemos observar a rede de interação das proteínas identificadas neste trabalho e envolvidas na formação da vesícula de clatrina. Adicionalmente colocamos de maneira ilustrativa figuras de artigos publicados que mostram a localização celular e a interação entre as proteínas em questão.

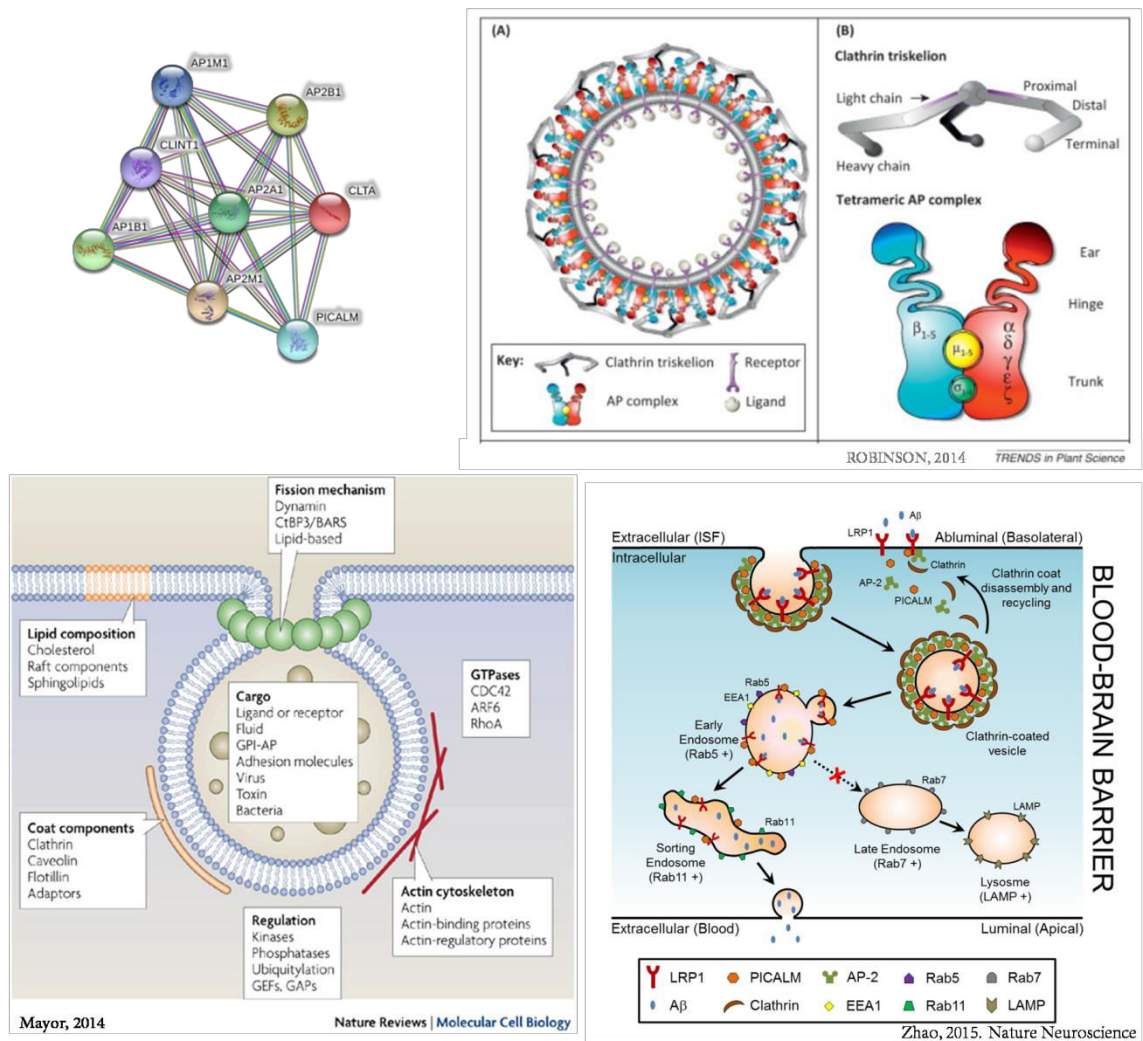


Figura 54. Rede de interação de proteínas identificadas na amostra PGLI-M envolvidos na formação de vesículas recobertas por clatrina. Software: Sting v10. As imagens adicionais são ilustrativas das proteínas estudadas. As imagens foram extraídas de Robinson, 2014 (136), Mayor, 2014 (138) e Zhao, 2015 (139). Robinson mostra a estrutura molecular do complexo clatrina e moléculas adaptadoras. Mayor mostra o papel da vesícula de clatrina.. Zhao mostra a relação da vesícula de clatrina com as moléculas adaptadoras e PICALM.

Adicionalmente foram detectados proteínas do endossomo inicial como RAB5 e do endossomo tardio como RAB7A e proteínas lisossomais como LAMP1 e as ATPases: ATP6V1/B2, ATP6V0D1, ATP6V1H, ATP6V1C1 (140,141) (Figura 54). Portanto, a identificação destas proteínas estruturais da vesícula de clatrina, assim como das proteínas ligadas ao endossomo precoce e tardio e das proteínas lisossomais na amostra de PGLI-M, nos direciona para uma maior compreensão do processo de internalização do *M. leprae* em CS e do papel do PGLI neste processo. Alves e colaboradores (142) verificaram que a internalização do *M. leprae* em CS-ST88-14 é dependente de vias de sinalização celular envolvidas no processo de

fagocitose. No mesmo trabalho, verificou-se a localização do bacilo vivo em vesículas não acidificadas em CS e macrófagos da linhagem RAW. Estes resultados indicam que o patógeno é capaz de modular ativamente a via endocítica na célula hospedeira, inibindo a fusão fagolisossomal e favorecendo sua sobrevivência. Nós detectamos entre os ligantes de PGLI a proteína coronina 1A (CORO1A). *M. bovis* BCG e *M. leprae* usam esta proteína para escapar do sistema imune (141–144).

A infecção micobacteriana leva ao recrutamento da proteína CORO1A, que inibe a fusão fago-lisosomal promovendo a sobrevivência dos bacilos. Adicionalmente, já foi descrita a presença de CORO1A na membrana de fagossomas que contêm *M. leprae* (143). Foi observado também que o acúmulo de CORO1A em lesões hansênicas é maior em lesões de estágio tardio onde existem mais bacilos destruídos (143). Suzuki e colaboradores sugerem que algum componente do bacilo que se acumula no fagossoma pode contribuir à retenção do CORO1A no fagossoma (144). No entanto, o fator micobacteriano que contribui à ancoragem de CORO1A ainda não foi determinado (145). Para cepas *Helicobacter pylori* se observou que a toxina, VacA, tem um papel importante na retenção de CORO1A, assim como a interrupção da fusão fagolisossomal (146). Os nossos dados sugerem que o PGLI pode ter um papel importante na retenção de CORO1A e consequentemente na sobrevivência do *M. leprae*.

Além do processo de adesão e internalização focamos nas redes de interação com proteínas ligadas ao metabolismo lipídico e sobretudo a modulação de PPAR γ . Foram detectadas proteínas ativadoras de PPAR como C/EBP α e C/EBP δ (147). Estudar mais estas proteínas permitiria talvez entender o processo pelo qual o PGLI induz a formação de corpúsculos lipídicos.

Os dados obtidos usando o enfoque “pull-down”-nLC-NS/MS nos dão pistas sobre os acontecimentos iniciais da interação do bacilo e a célula hospedeira e poderão nos direcionar para uma melhor compreensão das vias ativadas pós-internalização. Estes dados serão analisados com mais detalhe e posteriormente contrastados com os ligantes obtidos no extrato de proteínas de citosol de CS para tentar obter um panorama mais completo dos acontecimentos quando *M. leprae* se encontra dentro da célula hospedeira.

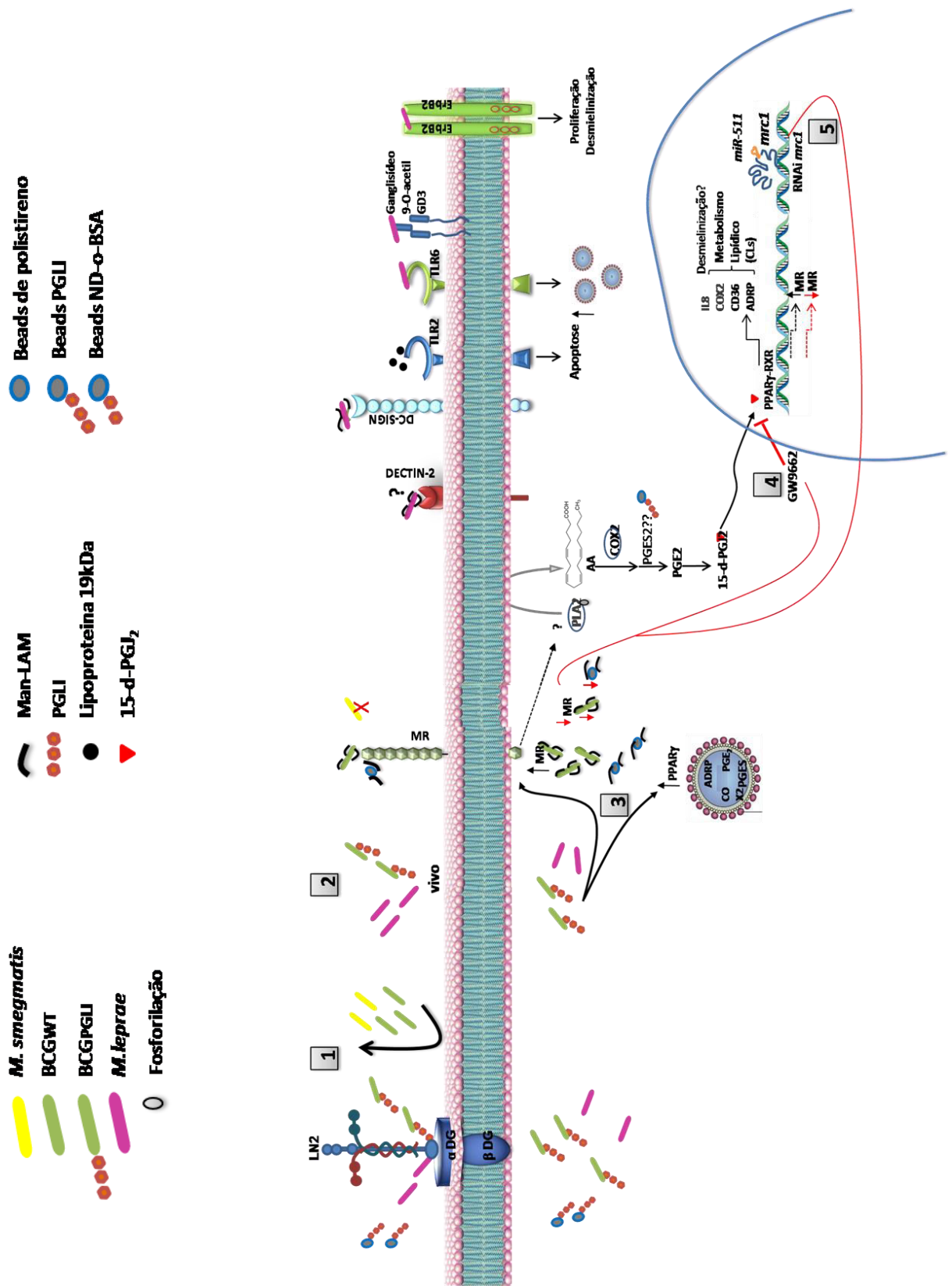


Figura 55. Resumo dos resultados obtidos envolvendo o papel do receptor de manose e do fator de transcrição PPAR γ na internalização de micobactérias em CS-ST8814.

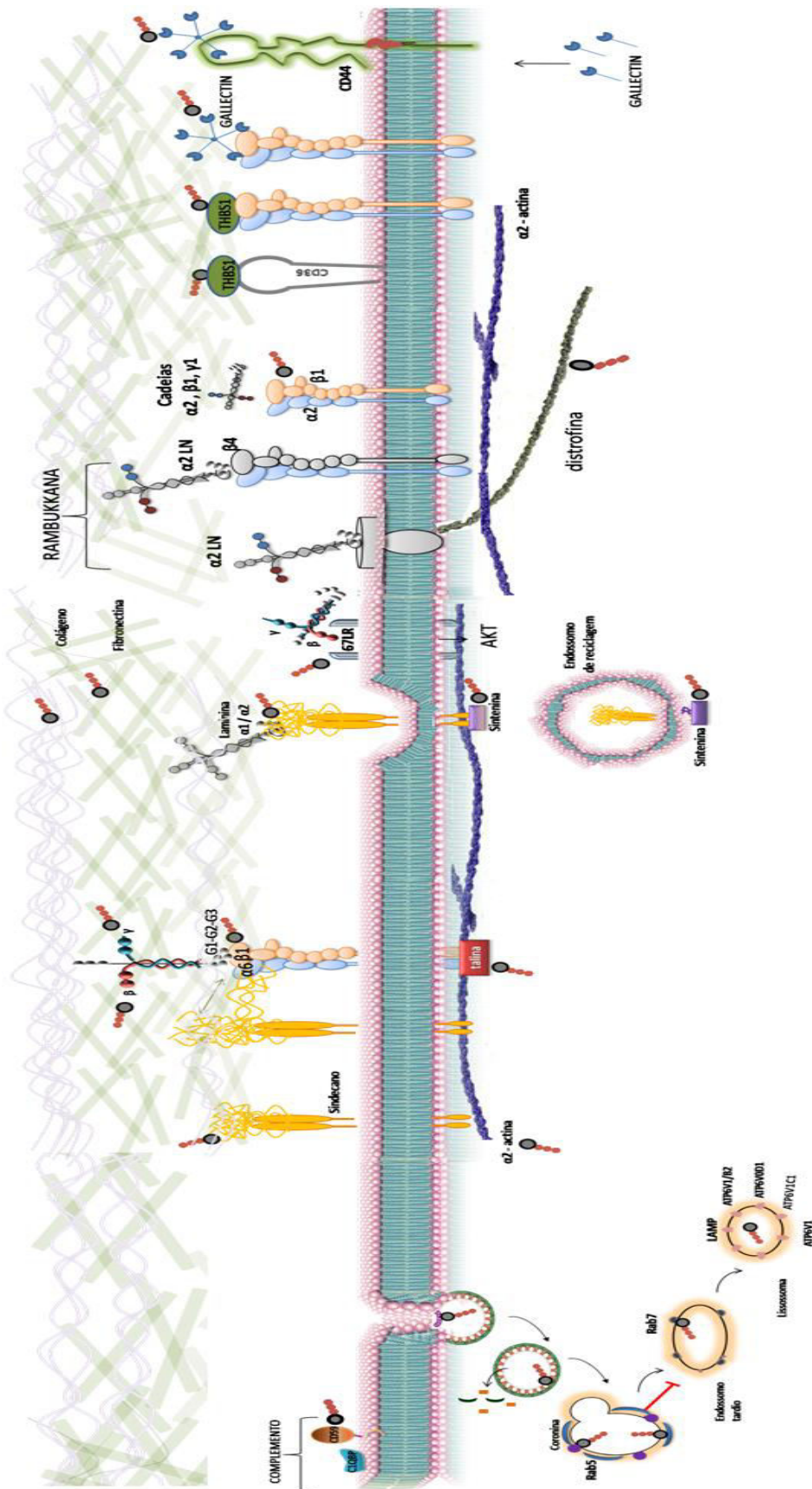


Figura 56. Resumo dos resultados obtidos envolvendo os candidatos receptores ou ligantes de PGLI identificados no extrato enriquecido em proteínas de membrana de CS-ST8814.

CONCLUSÃO

A utilização de cepas de BCG recombinantes expressando PGLs de *M. leprae* e de *M. tuberculosis* confirmou que o PGLI, glicolípido específico do *M. leprae*, é um componente fundamental do envelope micobacteriano necessário para sua internalização na CS. Os dois resíduos monossacarídicos da extremidade não redutora do trissacario que compõe a molécula são responsáveis pela ligação da bactéria a componentes da célula hospedeira e posterior internalização. Também constatamos que a viabilidade dos bacilos impacta no grau de internalização nas CS, os vivos apresentando maior eficiência de internalização. Isso possivelmente se deve à capacidade das bactérias vivas de modular o repertório de receptores de fagocitose da célula hospedeira, facilitando a entrada de novas bactérias por vias alternativas. Dentre estes receptores, mostramos que o receptor de manose CD206 é induzido pela bactéria viva na CS e que esta indução é mediada pelo fator de transcrição PPAR γ . Também mostramos que a indução de CLs pelo *M. leprae* tem participação do PGLI e que esta indução também é mediada pelo fator nuclear PPAR γ que por sua vez regula positivamente a expressão dos genes *adrp* e *cd36* em CS infectadas. Finalmente, a técnica de “pull-down”-nLC-MS/MS se mostrou promissora na identificação de candidatos ligantes de PGLI em extrato enriquecido de proteínas de membrana de CS. Isto pode nos ajudar a entender melhor o processo de internalização de *M. leprae* via PGLI, assim como processos metabólicos ou vias de sinalização modulados por esta molécula. Em conjunto, nossos dados sugerem a aquisição de um fenótipo “M2-like” por CS infectadas com *M. leprae* em que a viabilidade bacteriana e a expressão de PGLI têm participação fundamental (Figura 57). A aquisição deste fenótipo contribuiria para a sobrevivência e proliferação do bacilo, favorecendo a persistência da infecção.

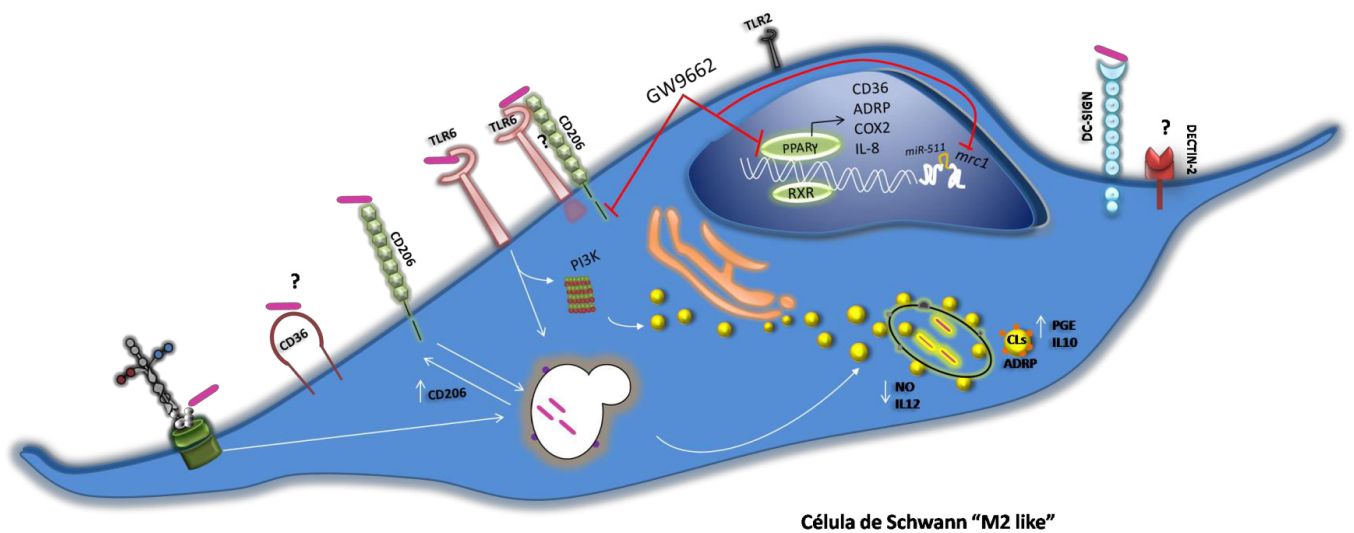


Figura 57. Mecanismos moleculares que regulam a internalização de *M. leprae* e a biogênese e recrutamento de CLs em células de Schwann.

A internalização de *M. leprae* vivo via o complexo laminina-distroglicano modifica o repertório de receptores fagocíticos da célula de Schwann aumentando a expressão de receptores lectina tipo C como CD206 e CD209. *M. leprae* vivo induz a expressão e ativação de PPAR γ . Existe um cross-talk entre PPAR γ e CD206 que resulta num mecanismo de controle de expressão mútua. A indução de PPAR γ também resulta na produção de IL8, no aumento de CD36, de ADRP e na biogênese de CLs. Adicionalmente a internalização via TLR6, mas não TLR2 induz também a formação de CLs. Existe um recrutamento via PI3k de CLs para o fagossoma que contem *M. leprae*. Os CLs são sítios ricos em PGE2 e contribuem à formação de citocinas tipo Th2. Isto favorece a sobrevivência intracelular do patógeno.

BIBLIOGRAFIA

1. Hansen, G A. Undersögelser angaaende spedalskhedens arsager. 1874. 4:1–88.
2. Donoghue HD, Michael Taylor G, Marcsik A, Molnár E, Pálfi G, Pap I, et al. A migration-driven model for the historical spread of leprosy in medieval Eastern and Central Europe. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. abril de 2015;31:250–6.
3. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*. dezembro de 2009;41(12):1282–9.
4. Lastória JC, Abreu MAMM de, Lastória JC, Abreu MAMM de. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *An Bras Dermatol*. abril de 2014;89(2):205–18.
5. Cunha SS, Dourado I, Barreto ML, Alexander N, Pereira SM, Ichihara Y, et al. Design of the leprosy component of the Brazilian BCG revaccination trial for assessing BCG effectiveness against leprosy in school children. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. março de 2004;72(1):8–15.
6. Mohanty PS, Naaz F, Katara D, Misba L, Kumar D, Dwivedi DK, et al. Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. fevereiro de 2016;82(1):23–7.
7. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg*. março de 2008;78(3):518–21.
8. Visschedijk J, van de Broek J, Eggens H, Lever P, van Beers S, Klatser P. Review: *Mycobacterium leprae* – millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. *Trop Med Int Health*. 1 de junho de 2000;5(6):388–99.
9. Araújo MG. [Leprosy in Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. junho de 2003;36(3):373–82.
10. Basombrio G, Gatti JC, Cardama JE, Colombo CV. [Experience with T.B. 1-698 in the treatment of leprosy]. *El Día Méd*. 3 de janeiro de 1953;25(1):4–5.
11. Fujita M, Miyachi Y, Nakata K, Imamura S. Appearance of gamma delta T cell receptor-positive cells following alpha beta T cell receptor-positive cells in the lepromin reaction of human skin. *Immunol Lett*. janeiro de 1993;35(1):39–44.
12. Petri V, Mendes EV, Beiguelman B. Histology of the Mitsuda reaction of healthy adults with no known contacts with leprosy patients. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. dezembro de 1985;53(4):540–5.
13. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. setembro de 1966;34(3):255–73.

14. Virchow R. Die krankhaften geschwulste. 1863.
15. Sakurai I, Skinsnes OK. Lipids in leprosy. 2. Histochemistry of lipids in human leprosy. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* dezembro de 1970;38(4):389–403.
16. Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa M-T, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J Clin Invest.* 1 de agosto de 2008;118(8):2917–28.
17. Montoya D, Modlin RL. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Adv Immunol.* 2010;105:1–24.
18. Mattos KA, D’Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol.* março de 2010;87(3):371–84.
19. Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC, Rodrigues LS, D’Avila H, Melo RCN, et al. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol.* 2011;13(2):259–73.
20. Scollard DM. The biology of nerve injury in leprosy. *Lepr Rev.* setembro de 2008;79(3):242–53.
21. Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin Dermatol.* fevereiro de 2015;33(1):46–54.
22. Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff TH. The role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae* in the immunopathogenesis of nerve damage in leprosy. *Lepr Rev.* dezembro de 2000;71 Suppl:S121–9.
23. Ottenhoff THM, Klein MR. Leprosy bacillus triggers the wrong cells. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* setembro de 2005;73(3):208–10.
24. Rambukkana A. *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. *Curr Opin Immunol.* agosto de 2004;16(4):511–8.
25. Tapinos N, Ohnishi M, Rambukkana A. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. *Nat Med.* agosto de 2006;12(8):961–6.
26. Shepard CC, McRae DH. *Mycobacterium leprae* in Mice: Minimal Infectious Dose, Relationship Between Staining Quality and Infectivity, and Effect of Cortisone. *J Bacteriol.* fevereiro de 1965;89(2):365–72.
27. Shetty VP, Suchitra K, Uplekar MW, Antia NH. Higher incidence of viable *Mycobacterium leprae* within the nerve as compared to skin among multibacillary leprosy patients released from multidrug therapy. *Lepr Rev.* junho de 1997;68(2):131–8.

28. Silva CAM, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun.* julho de 2013;81(7):2645–59.
29. Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB, et al. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech.* janeiro de 2013;6(1):19–24.
30. Truman RW, Krahenbuhl JL, Viable M. *leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* março de 2001;69(1):1–12.
31. Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *J Med Microbiol.* março de 2005;54(Pt 3):235–42.
32. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* setembro de 2005;1(1):e5.
33. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 22 de fevereiro de 2001;409(6823):1007–11.
34. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 11 de junho de 1998;393(6685):537–44.
35. Eiglmeier K, Parkhill J, Honoré N, Garnier T, Tekaiia F, Telenti A, et al. The decaying genome of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev.* dezembro de 2001;72(4):387–98.
36. Brennan PJ, Spencer JS. The Role of *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid I (PGL-I) in Serodiagnosis and in the Pathogenesis of Leprosy. [citado 26 de março de 2013]; Recuperado de: <http://www.leprahealthinaction.org/lr/Dec11/1721.pdf>
37. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that Spur Autophagy and Immunity. *Immunol Rev.* setembro de 2012;249(1):158–75.
38. Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol.* julho de 2004;53(2):391–403.
39. Daffé M, Laneelle MA. Distribution of phthiocerol diester, phenolic mycosides and related compounds in mycobacteria. *J Gen Microbiol.* julho de 1988;134(7):2049–55.
40. Brennan PJ, Barrow WW. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* dezembro de 1980;48(4):382–7.

41. Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol.* setembro de 1981;147(3):728–35.
42. Payne SN, Draper P, Rees RJ. Serological activity of purified glycolipid from *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* junho de 1982;50(2):220–1.
43. Young DB, Buchanan TM. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. *Science.* 9 de setembro de 1983;221(4615):1057–9.
44. Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev.* dezembro de 2011;82(4):344–57.
45. Moura RS de, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41 Suppl 2:11–8.
46. Tuomanen E. Can microbial pathogenesis team up with immunology? *Trends Microbiol.* dezembro de 1995;3(12):456–7.
47. Rambukkana A. Molecular basis of the interaction of *Mycobacterium leprae* with peripheral nerve: implications for therapeutic strategies. *Lepr Rev.* dezembro de 2000;71 Suppl:S168–9.
48. Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-Dependent Demyelination by *Mycobacterium leprae* in the Absence of Immune Cells. *Science.* 5 de março de 2002;296(5569):927–31.
49. Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, et al. Expression of Toll-Like Receptor 2 on Human Schwann Cells: a Mechanism of Nerve Damage in Leprosy. *Infect Immun.* 3 de janeiro de 2003;71(3):1427–33.
50. Teles RMB, Krutzik SR, Ochoa MT, Oliveira RB, Sarno EN, Modlin RL. Interleukin-4 Regulates the Expression of CD209 and Subsequent Uptake of *Mycobacterium leprae* by Schwann Cells in Human Leprosy. *Infect Immun.* 11 de janeiro de 2010;78(11):4634–43.
51. Ribeiro-Resende VT, Ribeiro-Guimarães ML, Lemes RMR, Nascimento IC, Alves L, Mendez-Otero R, et al. Involvement of 9-O-Acetyl GD3 ganglioside in *Mycobacterium leprae* infection of Schwann cells. *J Biol Chem.* 29 de outubro de 2010;285(44):34086–96.
52. T E Thompson, Tillack and TW. Organization of Glycosphingolipids in Bilayers and Plasma Membranes of Mammalian Cells. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1985;14(1):361–86.
53. Mattos KA, Oliveira VGC, D’Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, et al. TLR6-Driven Lipid Droplets in *Mycobacterium leprae*-Infected Schwann Cells: Immunoinflammatory Platforms Associated with Bacterial Persistence. *J Immunol.* 9 de janeiro de 2011;187(5):2548–58.

54. Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural Targeting of Mycobacterium leprae Mediated by the G Domain of the Laminin- α 2 Chain. *Cell*. 21 de março de 1997;88(6):811–21.
55. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae. *Cell*. 27 de outubro de 2000;103(3):511–24.
56. Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae. *Curr Opin Microbiol*. 1 de fevereiro de 2001;4(1):21–7.
57. Marques MA, Ant nio VL, Sarno EN, Brennan PJ, Pessolani MC. Binding of alpha2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells. *J Med Microbiol*. janeiro de 2001;50(1):23–8.
58. Belkin AM, Stepp MA. Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech*. 1 de novembro de 2000;51(3):280–301.
59. Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*. 1 de junho de 2000;218(2):213–34.
60. Yokoyama F, Suzuki N, Haruki M, Nishi N, Oishi S, Fujii N, et al. Cyclic peptides from the loop region of the laminin alpha 4 chain LG4 module show enhanced biological activity over linear peptides. *Biochemistry (Mosc)*. 26 de outubro de 2004;43(42):13590–7.
61. Talts JF, Andac Z, Göhring W, Brancaccio A, Timpl R. Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J*. 15 de fevereiro de 1999;18(4):863–70.
62. Ardini E, Tagliabue E, Magnifico A, Butò S, Castronovo V, Colnaghi MI, et al. Co-regulation and Physical Association of the 67-kDa Monomeric Laminin Receptor and the α 6 β 4 Integrin. *J Biol Chem*. 24 de janeiro de 1997;272(4):2342–5.
63. Fatehullah A, Doherty C, Pivato G, Allen G, Devine L, Nelson J, et al. Interactions of the 67 kDa laminin receptor and its precursor with laminin. *Biosci Rep*. 10 de novembro de 2009;30(Pt 2):73–9.
64. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol*. 12 de janeiro de 2012;92(6):1177–86.
65. Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov*. maio de 2013;12(5):388–404.
66. Guirado E, Schlesinger LS, Kaplan G. Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Semin Immunopathol*. setembro de 2013;35(5):563–83.
67. Baetas-da-Cruz W, Alves L, Pessolani MCV, Barbosa HS, Régnier-Vigouroux A, Corte-Real S, et al. Schwann cells express the macrophage mannose receptor and MHC

- class II. Do they have a role in antigen presentation? *J Peripher Nerv Syst JPNS*. junho de 2009;14(2):84–92.
68. Macedo-Ramos H, Batista AF, Carrier-Ruiz A, Alves L, Allodi S, Ribeiro-Resende VT, et al. Evidence of involvement of the mannose receptor in the internalization of *Streptococcus pneumoniae* by Schwann cells. *BMC Microbiol*. 2 de agosto de 2014;14(1):211.
 69. Alter A, de Léséleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. *Hum Genet*. março de 2010;127(3):337–48.
 70. Källenius G, Correia-Neves M, Buteme H, Hamasur B, Svenson SB. Lipoarabinomannan, and its related glycolipids, induce divergent and opposing immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* depending on structural diversity and experimental variations. *Tuberc Edinb Scotl*. janeiro de 2016;96:120–30.
 71. Harrisingh MC, Perez-Nadales E, Parkinson DB, Malcolm DS, Mudge AW, Lloyd AC. The Ras/Raf/ERK signalling pathway drives Schwann cell dedifferentiation. *EMBO J*. 4 de agosto de 2004;23(15):3061–71.
 72. Noon LA, Lloyd AC. Treating leprosy: an Erb-al remedy? *Trends Pharmacol Sci*. março de 2007;28(3):103–5.
 73. Hess S, Rambukkana A. Bacterial-induced cell reprogramming to stem cell-like cells: new premise in host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*. fevereiro de 2015;23:179–88.
 74. Montero MT, Matilla J, Gómez-Mampaso E, Lasunción MA. Geranylgeraniol Regulates Negatively Caspase-1 Autoprocessing: Implication in the Th1 Response against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 15 de outubro de 2004;173(8):4936–44.
 75. Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* Actively Modulates the Cytokine Response in Naïve Human Monocytes. *Infect Immun*. 1 de janeiro de 2010;78(1):293–300.
 76. Tabouret G, Astarie-Dequeker C, Demangel C, Malaga W, Constant P, Ray A, et al. *Mycobacterium leprae* Phenolglycolipid-1 Expressed by Engineered *M. bovis* BCG Modulates Early Interaction with Human Phagocytes. Ehrt S, organizador. *PLoS Pathog*. 21 de outubro de 2010;6(10):e1001159.
 77. Manca C, Peixoto B, Malaga W, Guilhot C, Kaplan G. Modulation of the Cytokine Response in Human Monocytes by *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid-1. *J Interferon Cytokine Res*. janeiro de 2012;32(1):27–33.
 78. Tanigawa K, Suzuki K, Nakamura K, Akama T, Kawashima A, Wu H, et al. Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol Lett*. 1 de dezembro de 2008;289(1):72–9.

79. Mattos KA, Oliveira VCG, Berrêdo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LCM, Melo RCN, et al. Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol.* 2014;16(6):797–815.
80. Bozza PT, Magalhães KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* junho de 2009;1791(6):540–51.
81. Melo RCN, D’Avila H, Wan H-C, Bozza PT, Dvorak AM, Weller PF. Lipid Bodies in Inflammatory Cells. *J Histochem Cytochem.* maio de 2011;59(5):540–56.
82. Lobato LS, Rosa PS, Ferreira J da S, Neumann A da S, da Silva MG, do Nascimento DC, et al. Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrob Agents Chemother.* outubro de 2014;58(10):5766–74.
83. Brown JD, Plutzky J. Peroxisome Proliferator–Activated Receptors as Transcriptional Nodal Points and Therapeutic Targets. *Circulation.* 30 de janeiro de 2007;115(4):518–33.
84. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.* maio de 2013;99(5):557–66.
85. Tavares V, Hirata MH, Hirata RDC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach. *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol.* junho de 2007;51(4):526–33.
86. Gao J, Serrero G. Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) Expressed in Transfected COS-7 Cells Selectively Stimulates Long Chain Fatty Acid Uptake. *J Biol Chem.* 6 de novembro de 1999;274(24):16825–30.
87. D’Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol.* outubro de 2008;8(10):1308–15.
88. Turró S, Ingelmo-Torres M, Estanyol JM, Tebar F, Fernández MA, Albor CV, et al. Identification and characterization of associated with lipid droplet protein 1: A novel membrane-associated protein that resides on hepatic lipid droplets. *Traffic Cph Den.* setembro de 2006;7(9):1254–69.
89. Lamprou I, Mamali I, Dallas K, Fertakis V, Lampropoulou M, Marmaras VJ. Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes. *Immunology.* julho de 2007;121(3):314–27.
90. Carvalho PC, Fischer JS, Chen EI, Yates JR, Barbosa VC. PatternLab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:316.
91. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, Santos MDM, Fischer JSG, Aquino PF, et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc.* janeiro de 2016;11(1):102–17.

92. Li X, Wang W, Chen J. From pathways to networks: connecting dots by establishing protein-protein interaction networks in signaling pathways using affinity purification and mass spectrometry. *Proteomics*. janeiro de 2015;15(0):188–202.
93. Carazzolle MF, Carvalho LM de, Slepicka HH, Vidal RO, Pereira GAG, Kobarg J, et al. IIS – Integrated Interactome System: A Web-Based Platform for the Annotation, Analysis and Visualization of Protein-Metabolite-Gene-Drug Interactions by Integrating a Variety of Data Sources and Tools. *PLOS ONE*. 20 de junho de 2014;9(6):e100385.
94. Berry A, Balard P, Coste A, Olagnier D, Lagane C, Authier H, et al. IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPAR γ activation. *Eur J Immunol*. junho de 2007;37(6):1642–52.
95. Coste A, Dubourdeau M, Linas MD, Cassaing S, Lepert J-C, Balard P, et al. PPAR γ Promotes Mannose Receptor Gene Expression in Murine Macrophages and Contributes to the Induction of This Receptor by IL-13. *Immunity*. setembro de 2003;19(3):329–39.
96. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Töröcsik D, D’Avila H, Dezsö B, et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de julho de 2009;183(2):1337–45.
97. Quesniaux VJ, Nicolle DM, Torres D, Kremer L, Guérardel Y, Nigou J, et al. Toll-Like Receptor 2 (TLR2)-Dependent-Positive and TLR2-Independent-Negative Regulation of Proinflammatory Cytokines by Mycobacterial Lipomannans. *J Immunol*. 4 de janeiro de 2004;172(7):4425–34.
98. Azad AK, Rajaram MVS, Schlesinger LS. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J Cytol Mol Biol [Internet]*. 10 de janeiro de 2014 [citado 29 de janeiro de 2016];1(1). Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3963702/>
99. Schlesinger LS, Hull SR, Kaufman TM. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de abril de 1994;152(8):4070–9.
100. Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, et al. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity*. 18 de setembro de 2014;41(3):402–13.
101. Chieppa M, Bianchi G, Doni A, Del Prete A, Sironi M, Laskarin G, et al. Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de novembro de 2003;171(9):4552–60.
102. Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol*. fevereiro de 2005;26(2):104–10.

103. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* janeiro de 2003;3(1):23–35.
104. Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de junho de 2001;166(12):7477–85.
105. Astarie-Dequeker C, N'Diaye E-N, Le Cabec V, Rittig MG, Prandi J, Maridonneau-Parini I. The Mannose Receptor Mediates Uptake of Pathogenic and Nonpathogenic Mycobacteria and Bypasses Bactericidal Responses in Human Macrophages. *Infect Immun.* fevereiro de 1999;67(2):469–77.
106. Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, et al. The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med.* 3 de outubro de 2005;202(7):987–99.
107. Squadrito ML, Pucci F, Magri L, Moi D, Gilfillan GD, Ranghetti A, et al. miR-511-3p Modulates Genetic Programs of Tumor-Associated Macrophages. *Cell Rep.* 23 de fevereiro de 2012;1(2):141–54.
108. Montoya D, Cruz D, Teles RMB, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe.* 22 de outubro de 2009;6(4):343–53.
109. Ehrt S, Schnappinger D. Mycobacterium tuberculosis virulence: lipids inside and out. *Nat Med.* março de 2007;13(3):284–5.
110. Singh CR, Moulton RA, Armitage LY, Bidani A, Snuggs M, Dhandayuthapani S, et al. Processing and presentation of a mycobacterial antigen 85B epitope by murine macrophages is dependent on the phagosomal acquisition of vacuolar proton ATPase and in situ activation of cathepsin D. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de setembro de 2006;177(5):3250–9
111. Heinsbroek SEM, Squadrito ML, Schilderink R, Hilbers FW, Verseijden C, Hofmann M, et al. miR-511-3p, embedded in the macrophage mannose receptor gene, contributes to intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 4 de novembro de 2015;
112. Rajaram MVS, Brooks MN, Morris JD, Torrelles JB, Azad AK, Schlesinger LS. Mycobacterium tuberculosis activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de julho de 2010;185(2):929–42.
113. Almeida PE, Carneiro AB, Silva AR, Bozza PT, Almeida PE, Carneiro AB, et al. PPAR β ; Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing, PPAR β ; Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing. *PPAR Res* PPAR Res. 17 de julho de 2012;2012, 2012:e383829. 114. Pawliczak R, Logun C, Madara P, Lawrence M, Woszczek G, Ptasińska A, et al. Cytosolic phospholipase A2 Group IV α but not secreted phospholipase A2 Group

- IIA, V, or X induces interleukin-8 and cyclooxygenase-2 gene and protein expression through peroxisome proliferator-activated receptors gamma 1 and 2 in human lung cells. *J Biol Chem*. 19 de novembro de 2004;279(47):48550–61.
115. Rossi S, Motta C, Studer V, Rocchi C, Macchiarulo G, Barbieri F, et al. Interleukin-8 is associated with acute and persistent dysfunction after optic neuritis. *Mult Scler J*. 1 de dezembro de 2014;20(14):1841–50.
 116. Kota BP, Huang TH-W, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*. fevereiro de 2005;51(2):85–94.
 117. de Mattos KA, Sarno EN, Pessolani MCV, Bozza PT. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. dezembro de 2012;107 Suppl 1:156–66.
 118. Bouhlef MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, et al. PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. *Cell Metab*. 8 de agosto de 2007;6(2):137–43.
 119. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med*. janeiro de 2001;7(1):48–52.
 120. Elamin AA, Stehr M, Singh M. Lipid Droplets and *Mycobacterium leprae* Infection. *J Pathog* [Internet]. 2012 [citado 3 de outubro de 2013];2012. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3503283/>
 121. Kurup IG, Mahadevan PR. Cholesterol metabolism of macrophages in relation to the presence of *Mycobacterium leprae*. *J Biosci*. setembro de 1982;4(3):307–16.
 122. Baranova IN, Kurlander R, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Chen Z, Remaley AT, et al. Role of Human CD36 in Bacterial Recognition, Phagocytosis, and Pathogen-Induced JNK-Mediated Signaling. *J Immunol*. 15 de novembro de 2008;181(10):7147–56.
 123. Philips JA, Rubin EJ, Perrimon N. *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science*. 19 de agosto de 2005;309(5738):1251–3.
 124. Almeida PE, Roque NR, Magalhães KG, Mattos KA, Teixeira L, Maya-Monteiro C, et al. Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Biochim Biophys Acta*. janeiro de 2014;1841(1):97–107.
 125. Schreiber S, Perkins SL, Teitelbaum SL, Chappel J, Stahl PD, Blum JS. Regulation of mouse bone marrow macrophage mannose receptor expression and activation by prostaglandin E and IFN-gamma. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 de novembro de 1993;151(9):4973–81.
 126. D’Avila H, Melo RCN, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated

- formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 de março de 2006;176(5):3087–97.
127. Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, Bardou F, et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog.* novembro de 2008;4(11):e1000204.
 128. Cáceres N, Tapia G, Ojanguren I, Altare F, Gil O, Pinto S, et al. Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models. *Tuberc Edinb Scotl.* março de 2009;89(2):175–82.
 129. Malinoff HL, Wicha MS. Isolation of a cell surface receptor protein for laminin from murine fibrosarcoma cells. *J Cell Biol.* maio de 1983;96(5):1475–9.
 130. Rao CN, Goldstein IJ, Liotta LA. Lectin-binding domains on laminin. *Arch Biochem Biophys.* novembro de 1983;227(1):118–24.
 131. Nelson J, McFerran NV, Pivato G, Chambers E, Doherty C, Steele D, et al. The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *Biosci Rep.* 1 de fevereiro de 2008;28(1):33–48.
 132. Kong P, Cavalera M, Frangogiannis NG. The role of thrombospondin (TSP)-1 in obesity and diabetes. *Adipocyte.* 1 de janeiro de 2014;3(1):81–4.
 133. Schorey JS, Li Q, McCourt DW, Bong-Mastek M, Clark-Curtiss JE, Ratliff TL, et al. A *Mycobacterium leprae* gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. *Infect Immun.* julho de 1995;63(7):2652–7.
 134. Zimmermann P, Zhang Z, Degeest G, Mortier E, Leenaerts I, Coomans C, et al. Syndecan Recycling Is Controlled by Syntenin-PIP2 Interaction and Arf6. *Dev Cell.* 1 de setembro de 2005;9(3):377–88.
 135. Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol.* dezembro de 2007;8(12):957–69.
 136. Robinson DG, Pimpl P. Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends Plant Sci.* 1 de março de 2014;19(3):134–9.
 137. Hirst J, Robinson MS. Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta.* 14 de agosto de 1998;1404(1-2):173–93.
 138. Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* agosto de 2007;8(8):603–12.
 139. Zhao X, Liu L, Hegazy AM, Wang H, Li J, Zheng F, et al. Mannose receptor mediated phagocytosis of bacteria in macrophages of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a Ca²⁺-dependent manner. *Fish Shellfish Immunol.* abril de 2015;43(2):357–63.

140. Rai S, Tanaka H, Suzuki M, Ogoh H, Taniguchi Y, Morita Y, et al. Clathrin Assembly Protein CALM Plays a Critical Role in KIT Signaling by Regulating Its Cellular Transport from Early to Late Endosomes in Hematopoietic Cells. *PLoS ONE*. 3 de outubro de 2014;9(10):e109441.
141. Meo-Evoli N, Almacellas E, Massucci FA, Gentilella A, Ambrosio S, Kozma SC, et al. V-ATPase: a master effector of E2F1-mediated lysosomal trafficking, mTORC1 activation and autophagy. *Oncotarget*. 29 de setembro de 2015;6(29):28057–70.
142. Alves L, de Mendonça Lima L, da Silva Maeda E, Carvalho L, Holy J, Sarno EN, et al. *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;238(2):429–37.
143. Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*. 14 de maio de 1999;97(4):435–47.
144. Suzuki K, Takeshita F, Nakata N, Ishii N, Makino M. Localization of CORO1A in the Macrophages Containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochem Cytochem*. 30 de agosto de 2006;39(4):107–12.
145. Tanigawa K, Suzuki K, Kimura H, Takeshita F, Wu H, Akama T, et al. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin Exp Immunol*. junho de 2009;156(3):495–501.
146. Zheng P-Y, Jones NL. *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol*. janeiro de 2003;5(1):25–40.
147. Lee J-E, Ge K. Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR γ expression during adipogenesis. *Cell Biosci*. 2014;4:29.

ANEXOS

Anexo Tabela 1 : Proteínas totais identificadas por MS/MS nas amostras PGLI-M

Cod. Uniprot	Identificação	Comprimento Proteína (#AA)	Peso Molecular (Da)	Número de Peptídeos	Número de Espectros	Peptídeos únicos	Cobertura
Q15149	Isoform 2 of Plectin	4574	518139	129	562	11	30%
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	5890	628681	113	608	113	27%
P21333	Filamin-A	2647	280546	112	701	6	55%
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	3177	343439	75	416	3	31%
Q00610	Clathrin heavy chain 1	1675	191475	57	223	3	43%
Q13813	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	2472	284346	46	149	0	23%
O43707	Alpha-actinin-4	911	104771	42	234	26	44%
P35579	Myosin-9	1960	226374	39	154	1	24%
P13639	Elongation factor 2	858	95259	35	182	34	41%
P08670	Vimentin	466	53601	34	283	1	61%
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	364	39377	33	213	3	79%
P07237	Protein disulfide-isomerase	508	57063	32	238	4	48%
P02545	Prelamin-A/C	664	74077	31	185	2	45%
P60709	Actin, cytoplasmic 1	375	41692	30	195	2	58%
P50454	Serpin H1	418	46393	28	187	2	56%
Q01082	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	2364	274421	27	81	2	14%
P06733	Alpha-enolase	434	47121	25	237	3	56%
P14618	Pyruvate kinase PKM	531	57882	25	200	0	48%
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	806	89248	24	112	1	42%
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	910	101916	24	98	2	31%
Q5JP53	Tubulin beta chain	426	47718	23	166	0	60%
P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	1394	157787	23	39	1	20%
Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1	2115	238097	22	62	2	14%
P30101	Protein disulfide-isomerase A3	505	56729	21	158	1	48%
P49327	Fatty acid synthase	2511	273236	21	77	21	11%
P26038	Moesin	577	67760	19	112	1	31%
P14625	Endoplasmin	803	92393	19	75	0	27%
P07355	Annexin A2	339	38562	18	140	0	53%
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	335	36012	18	119	4	49%

P13667	Protein disulfide-isomerase A4	645	72869	18	98	3	27%
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1	607	68509	18	97	1	34%
Q14697	Isoform 2 of Neutral alpha-glucosidase AB	966	109351	18	86	18	21%
P19338	Nucleolin	710	76550	17	86	3	22%
Q99798	Aconitate hydratase, mitochondrial	780	85354	17	53	1	26%
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	462	50091	16	138	3	27%
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	463	50926	16	116	0	44%
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	463	51169	16	116	0	44%
P34897	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	504	55940	16	96	0	39%
P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial	452	49492	16	76	16	40%
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3	894	95261	16	66	1	19%
P51659	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	736	79618	16	61	16	32%
Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1	740	82362	16	50	2	23%
Q00341	Vigilin	1268	141350	16	47	0	16%
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	451	50086	15	128	2	41%
B5BUE6	ATP-dependent RNA helicase DDX5 (Fragment)	614	69060	15	93	0	26%
P26641	Elongation factor 1-gamma	437	50069	15	83	0	37%
Q6PUJ7	Epididymis luminal protein 215	272	29784	15	78	0	70%
Q92598	Heat shock protein 105 kDa	858	96786	15	47	3	20%
Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	1599	175364	15	36	1	10%
Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	440	48073	14	92	0	41%
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	417	44568	14	90	1	40%
P06748	Nucleophosmin	265	29428	14	82	0	45%
Q9ULV4	Coronin-1C	474	53197	14	76	1	32%
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	633	70881	14	70	0	26%
P05388	60S acidic ribosomal protein P0	317	34234	14	67	0	61%
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	1018	113710	14	60	0	22%
P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon	541	59615	14	58	2	30%
O00469	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	737	84614	14	57	1	22%
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	1023	112806	14	52	0	19%
P27824	Calnexin	592	67508	14	49	2	28%
P02786	Transferrin receptor protein 1	760	84800	14	48	14	20%

Q9BSJ8	Extended synaptotagmin-1	1104	122762	14	42	1	18%
P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	631	69223	14	41	1	35%
P17301	Integrin alpha-2	1181	129196	14	31	14	16%
P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	707	76084	13	72	2	19%
P43243	Matrin-3	847	94547	13	68	0	20%
Q9UHD8	Septin-9	579	64623	13	61	12	24%
P62136	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	330	37470	13	60	4	47%
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	1028	108444	13	49	0	18%
Q16881	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	649	70844	13	39	2	27%
B7Z5J7	cDNA FLJ58682, highly similar to Vesicle-fusing ATPase (EC 3.6.4.6)	739	81988	13	37	0	22%
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, isoform CRA_c	353	37389	12	99	0	36%
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	553	59696	12	76	2	20%
B4DWL1	cDNA FLJ59240, highly similar to Far upstream element-binding protein 1	642	69790	12	72	0	20%
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1	531	57168	12	71	2	28%
Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	835	88475	12	61	2	21%
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	332	36647	12	55	3	31%
O00571	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	640	70778	12	47	0	23%
B2RDX5	cDNA, highly similar to Homo sapiens threonyl-tRNA synthetase (TARS)	711	82043	12	43	0	21%
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	1014	112994	12	37	0	16%
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	573	60998	11	85	0	27%
P06753	Tropomyosin alpha-3 chain	248	28997	11	77	0	34%
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	216	23710	11	75	2	35%
Q9NYG1	Caldesmon 1, isoform CRA_b	481	56411	11	71	0	24%
P51149	Ras-related protein Rab-7a	207	23457	11	70	11	52%
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform	263	29561	11	67	2	24%
P42167	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	454	50621	11	61	2	24%
J3KPX7	Prohibitin-2	298	33201	11	57	0	43%

P23396	40S ribosomal protein S3	243	26653	11	55	11	35%
Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1	999	111248	11	55	0	14%
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	609	69781	11	54	1	20%
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	432	47581	11	53	1	34%
P00367	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	558	61341	11	40	1	22%
O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase	494	54971	11	40	11	32%
Q53GN4	WD repeat domain 1, isoform CRA_a (Fragment)	606	66120	11	35	0	27%
P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	997	109602	11	33	0	15%
P13489	Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1, isoform CRA_a	456	49367	11	31	0	42%
B7ZLE5	FN1 protein	2193	240474	11	28	0	7%
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	1410	152363	11	25	1	10%
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta	531	57970	11	21	2	21%
Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	4646	532054	11	20	11	3%
P09382	Galectin-1	135	14688	10	80	10	78%
Q0QEN7	ATP synthase subunit beta (Fragment)	445	48065	10	66	0	30%
P16104	Histone H2AX	143	15117	10	66	6	45%
P30041	Peroxiredoxin-6	224	25001	10	66	0	50%
Q92945	Far upstream element-binding protein 2	711	73052	10	64	1	17%
P11940	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1, isoform CRA_c	419	47287	10	53	0	24%
P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	470	51821	10	34	0	24%
P13797	Isoform 3 of Plastin-3	585	65573	10	34	0	25%
P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	439	48751	10	33	0	30%
P61158	Actin-related protein 3	418	47323	10	32	2	29%
P50991	T-complex protein 1 subunit delta	539	57870	10	32	1	20%
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	556	60288	10	27	10	20%
E9PCY7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	429	47039	9	62	0	28%
Q06830	Peroxiredoxin-1	199	22078	9	62	6	51%
P29692	Elongation factor 1-delta	281	31085	9	61	0	38%
P08758	Annexin A5	320	35896	9	55	1	28%
G3V1A4	Cofilin 1 (Non-muscle), isoform CRA_a	149	16783	9	55	0	57%
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	589	64074	9	48	1	19%
P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	514	55752	9	46	0	21%

P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	968	106725	9	37	0	14%
Q13838	HCG2005638, isoform CRA_a	428	48942	9	37	0	24%
P55084	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	474	51244	9	37	0	22%
E9KL44	Epididymis tissue sperm binding protein Li 14m	763	82929	9	33	0	18%
B4DY09	Interleukin enhancer-binding factor 2	352	38868	9	33	0	35%
P36551	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	454	50102	9	31	9	26%
P11047	Laminin, gamma 1 (Formerly LAMB2), isoform CRA_a	1573	173882	9	29	0	7%
P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	664	72627	9	29	1	16%
P31930	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	480	52594	9	26	8	28%
P46013	Isoform Short of Antigen KI-67	2896	319230	9	25	2	3%
O75367	Core histone macro-H2A.1	372	39575	9	22	2	21%
P63244	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	317	35037	9	21	0	29%
P30050	60S ribosomal protein L12	165	17790	8	67	8	55%
A8K6Y1	Homo sapiens proliferation-associated 2G4, 38kDa (PA2G4)	367	40868	8	48	0	25%
P07737	Profilin-1	140	15027	8	48	8	56%
V9HW43	Epididymis secretory protein Li 102	205	22751	8	43	0	54%
B4E3E6	Highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	323	34150	8	38	0	24%
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	261	26888	8	36	8	51%
B4DRV4	cDNA FLJ55667, highly similar to Secreted protein acidic and rich in cysteine	212	24668	8	34	0	45%
A5PLK7	RCC2 protein (Fragment)	457	49629	8	34	0	22%
P50990	Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit theta	529	57590	8	33	0	17%
P05141	ADP/ATP translocase 2	298	32813	8	32	1	27%
P07858	Cathepsin B	339	37779	8	31	0	30%
P23526	Adenosylhomocysteinase	432	47667	8	30	8	20%
P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome	391	42288	8	30	8	17%
P62424	60S ribosomal protein L7a	266	29959	8	29	8	36%
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	406	46107	8	27	1	19%
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	825	90510	8	27	2	11%
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	592	64557	8	26	0	18%

P52272	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	691	73554	8	25	1	13%
P22234	Multifunctional protein ADE2	425	47031	8	25	2	18%
P18031	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	435	49917	8	25	1	21%
D6RER5	Septin-11	432	49759	8	23	0	29%
P55060	Exportin-2	971	110328	8	20	0	11%
Q9UJZ1	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	356	38492	8	19	8	29%
Q15459	Splicing factor 3A subunit 1	793	88813	8	18	1	9%
Q8NBJ5	Procollagen galactosyltransferase 1	622	71573	8	16	8	14%
Q96PK6	RNA-binding protein 14	669	69431	8	16	8	12%
P35606	Coatomer subunit beta'	906	102405	8	15	0	13%
P35606	Coatomer subunit beta'	877	98966	8	15	0	13%
O43143	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	795	90857	8	15	8	12%
O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2	412	45699	8	12	1	31%
Q9Y490	Talin-1	2541	269581	8	11	8	4%
P08865	40S ribosomal protein SA	295	32815	7	58	1	31%
P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	154	16803	7	54	0	36%
P09429	High mobility group protein B1	215	24860	7	44	0	27%
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	267	30100	7	43	0	28%
P18085	ADP-ribosylation factor 4	180	20480	7	35	4	52%
B2R6K4	cDNA, FLJ92996, highly similar to Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1 (GNB1), mRNA	340	37259	7	35	0	26%
B4DM10	cDNA FLJ58263, highly similar to Microtubule-associated protein 4	740	79489	7	32	0	12%
Q01105	Protein SET	265	30956	7	32	0	25%
P53621	Coatomer subunit alpha	1224	138240	7	31	1	7%
Q02218	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	1023	115843	7	30	0	9%
Q9NQC3	Isoform 2 of Reticulon-4	373	40275	7	28	0	28%
Q59ES3	Amino acid transporter (Fragment)	548	57336	7	27	1	16%
P35222	Catenin (Cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa, isoform CRA_a	781	85424	7	27	0	10%
P62280	40S ribosomal protein S11	158	18401	7	25	7	33%

A8K9K4	cDNA FLJ75504, highly similar to Homo sapiens glucosidase I, mRNA	562	62182	7	25	0	20%
Q99832	T-complex protein 1 subunit eta	499	54752	7	25	0	23%
Q658U4	Putative uncharacterized protein DKFZp666D193	582	64073	7	25	0	16%
P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29	261	28957	7	24	1	24%
Q2Q9H2	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (Fragment)	475	54772	7	24	0	18%
P14868	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	501	57082	7	23	0	17%
Q8NC51	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	393	43092	7	23	0	17%
Q9Y4P3	Transducin beta-like protein 2	447	49748	7	22	1	19%
P09211	Glutathione S-transferase P	210	23323	7	20	1	35%
P48449	Isoform 2 of Lanosterol synthase	652	74152	7	20	1	11%
B2RBR9	cDNA, FLJ95650, highly similar to Homo sapiens karyopherin (importin) beta 1 (KPNB1), mRNA	876	97104	7	19	0	11%
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	1019	108494	7	19	1	6%
O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	300	34294	7	18	2	23%
P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	298	32957	7	18	1	29%
Q9UKM9	RNA-binding protein Raly	306	32426	7	17	2	14%
P63010	AP-2 complex subunit beta	937	104468	7	16	1	11%
V9HW96	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (Beta), isoform CRA_b	535	57434	7	16	0	19%
Q96QK1	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	796	91631	7	16	1	9%
Q8TAF6	Acyl-CoA synthetase 4	670	74356	7	15	0	14%
P33176	Kinesin-1 heavy chain	963	109599	7	15	1	9%
P46060	Ran GTPase-activating protein 1	587	63484	7	15	0	14%
Q8WUI6	COPG protein (Fragment)	699	78088	7	14	0	14%
Q86VP6	Isoform 2 of Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	1062	117796	7	14	0	9%
Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	1233	143126	7	14	2	4%
B4DS66	cDNA FLJ54290, highly similar to Mitochondrial inner membrane protein	660	73320	7	12	0	16%
Q16666	Gamma-interferon-inducible protein 16	785	88181	7	12	2	7%
P49915	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	693	76649	7	12	7	16%
Q14764	Major vault protein	893	99248	7	12	1	11%
P12270	Nucleoprotein TPR	2363	267113	7	11	7	4%

O60716	Catenin delta-1	968	108085	7	10	3	6%
P62258	14-3-3 protein epsilon	255	29137	6	48	0	29%
P15559	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	274	30830	6	41	1	26%
Q14444	Caprin-1	649	72693	6	36	0	11%
P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	168	19636	6	35	0	39%
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1	356	37456	6	34	0	21%
P04083	Annexin A1	346	38672	6	33	0	23%
Q6FI03	G3BP protein	466	52114	6	33	0	14%
P00387	NADH-cytochrome b5 reductase 3	301	34195	6	33	0	17%
P62241	40S ribosomal protein S8	208	24172	6	32	1	29%
Q53FB0	Chloride intracellular channel protein (Fragment)	241	26980	6	31	0	32%
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	324	35885	6	31	0	28%
K7ENG2	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	307	33862	6	31	0	28%
V9HWC2	Epididymis secretory sperm binding protein Li 67p	189	19861	6	30	0	46%
P47756	Isoform 2 of F-actin-capping protein subunit beta	272	30591	6	30	0	23%
P61254	60S ribosomal protein L26	145	17230	6	28	0	30%
P38117	Electron transfer flavoprotein subunit beta	255	27808	6	28	0	23%
G3V576	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	231	25223	6	28	0	22%
Q9Y265	RuvB-like 1	456	50178	6	28	1	14%
B4DY28	cDNA FLJ61189, highly similar to Cysteine and glycine-rich protein 1	187	20010	6	27	0	49%
P48444	Coatomer subunit delta	511	57156	6	27	0	13%
P12004	Proliferating cell nuclear antigen	261	28732	6	27	1	25%
P48735	Isoform 2 of Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	400	45133	6	26	0	16%
O43809	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	227	26193	6	25	0	28%
Q14019	Coactosin-like protein	142	15917	6	24	6	31%
O95793	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1	577	63125	6	23	1	10%
O00264	Membrane-associated progesterone receptor component 1	195	21640	6	23	1	38%
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	148	17231	6	22	1	36%
Q14847	LIM and SH3 domain protein 1	261	29680	6	21	2	16%
P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1	277	30338	6	20	6	26%
Q9Y696	Chloride intracellular channel protein 4	253	28736	6	20	1	20%

Q9BS26	Endoplasmic reticulum resident protein 44	406	46923	6	19	6	15%
P45974	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	858	95707	6	19	0	9%
P53396	ATP-citrate synthase	1101	120744	6	18	1	7%
P07339	Cathepsin D	412	44506	6	18	0	15%
J3QRD1	Fatty aldehyde dehydrogenase	393	44602	6	18	0	18%
P15880	40S ribosomal protein S2	293	31287	6	17	1	18%
Q9Y383	Isoform 2 of Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	391	46379	6	17	0	18%
Q53T09	Putative uncharacterized protein XRCC5 (Fragment)	568	64185	6	17	0	10%
Q13148	TAR DNA-binding protein 43	414	44693	6	17	1	20%
P26358	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	1616	183032	6	15	2	3%
P78344	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	907	102279	6	15	1	6%
Q9Y230	Isoform 2 of RuvB-like 2	418	46259	6	15	0	18%
Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	704	80042	6	14	0	9%
Q09028	Histone-binding protein RBBP4	425	47608	6	14	1	13%
Q15155	Nodal modulator 3	1100	121925	6	14	0	8%
P15144	Aminopeptidase N	967	109453	6	13	0	8%
P27797	Calreticulin	417	48094	6	13	0	24%
Q9UMS4	Pre-mRNA-processing factor 19	504	55128	6	13	6	16%
P61019	Ras-related protein Rab-2A	212	23513	6	13	1	32%
P54136	Isoform Monomeric of Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	588	67080	6	12	0	13%
Q9NZ08	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (Fragment)	941	107145	6	11	0	8%
P23588	Eukaryotic translation initiation factor 4B	611	69092	6	11	2	9%
P19367	Hexokinase-1	917	102402	6	11	0	8%
O95302	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	570	63026	6	11	2	11%
Q9UKX7	HCG1989366, isoform CRA_a	468	50095	6	9	0	19%
O94925	Isoform 3 of Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	598	65400	6	9	6	14%
P62805	Histone H4	103	11342	5	38	0	50%
J3QS39	Polyubiquitin-B (Fragment)	93	10445	5	36	0	46%
A8K651	cDNA FLJ75700, highly similar to Homo sapiens complement component 1, q subcomponent binding protein (C1QBP), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA	282	31343	5	35	0	26%
J3KTF8	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (Fragment)	194	21583	5	29	0	26%

O14773	Tripeptidyl-peptidase 1	563	61192	5	28	0	15%
Q6FHU2	Epididymis secretory protein Li 35 (Fragment)	254	28768	5	27	0	26%
B4DPZ5	cDNA FLJ53495, highly similar to Polymerase I and transcript release factor	363	40441	5	25	0	15%
V9HW95	Epididymis secretory protein Li 84	331	38848	5	25	0	19%
Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1	248	27710	5	25	0	18%
P62249	40S ribosomal protein S16	146	16417	5	24	2	18%
B7Z4L7	cDNA FLJ59035, highly similar to RNA-binding region-containing protein 2	337	36423	5	24	0	18%
B4DFL1	Dihydrolipoyl dehydrogenase	459	48850	5	23	0	14%
P09496	Clathrin light chain A	248	27042	5	22	1	19%
Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	248	27350	5	22	1	25%
Q9NR12	PDZ and LIM domain protein 7	457	49795	5	22	5	12%
P54709	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	279	31474	5	22	5	22%
P62081	40S ribosomal protein S7	194	22095	5	20	5	30%
Q6NZ55	60S ribosomal protein L13	211	24233	5	20	0	23%
P62820	Ras-related protein Rab-1A	205	22645	5	20	1	18%
O15143	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	372	40905	5	19	1	17%
Q13200	Isoform 2 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	749	82123	5	19	1	6%
B4DY23	cDNA FLJ61188, highly similar to Basigin	262	28396	5	18	0	22%
Q53HG7	Cortactin, isoform CRA_c	513	57414	5	18	0	10%
P61224	Isoform 3 of Ras-related protein Rap-1b	165	18749	5	18	0	40%
P49257	Protein ERGIC-53	510	57495	5	18	1	7%
Q9BWD1	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	397	41306	5	17	0	23%
P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	427	45153	5	17	5	11%
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	758	85791	5	17	1	9%
Q9Y5M8	Signal recognition particle receptor subunit beta	271	29666	5	17	1	22%
Q5JR07	Rho-related GTP-binding protein RhoC (Fragment)	127	14357	5	16	0	63%
P68036	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	154	17832	5	16	1	39%
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	115	11640	5	15	1	59%
Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	634	71307	5	15	1	6%

B3KSC3	cDNA FLJ35987 fis, clone TESTI2014269, highly similar to D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	499	52961	5	15	0	12%
P13804	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	333	35040	5	15	0	23%
Q9UHB6	Isoform 5 of LIM domain and actin-binding protein 1	600	67058	5	15	0	10%
Q02809	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	727	83479	5	15	0	8%
P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase	919	103193	5	15	0	8%
Q59EY4	CDC10 protein variant (Fragment)	381	43781	5	14	0	20%
Q15738	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	373	41856	5	14	5	17%
B4DI19	cDNA FLJ59524, highly similar to CysteinyI-tRNA synthetase (EC 6.1.1.16)	662	75620	5	13	0	11%
F8VS02	Alpha-aminoacidic semialdehyde dehydrogenase	475	51360	5	12	0	15%
P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	318	35514	5	12	1	16%
Q9H9B4	Sideroflexin-1	322	35578	5	12	5	22%
B3KVB6	cDNA FLJ41699 fis, clone HCHON2004776, highly similar to Homo sapiens cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4), mRNA	521	58098	5	11	0	12%
P53618	Coatomer subunit beta	953	107056	5	11	5	6%
P50570	Dynammin-2	870	97985	5	11	0	7%
P56537	Eukaryotic translation initiation factor 6	245	26564	5	11	5	36%
Q86UP2	Kinectin	1357	156161	5	11	0	5%
P61421	V-type proton ATPase subunit d 1	351	40285	5	11	0	19%
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	795	87230	5	10	0	7%
P25685	DnaJ homolog subfamily B member 1	340	38002	5	10	0	21%
Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	335	36027	5	9	1	17%
A8KAK1	cDNA FLJ77398, highly similar to Homo sapiens UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1, transcript variant 2, mRNA	1531	174879	5	9	0	5%
Q5JWF2	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	1037	110938	5	9	1	4%
Q9Y2W1	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	955	108583	5	9	5	5%
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	727	79399	5	8	1	9%

Q9HDC9	Isoform 2 of Adipocyte plasma membrane-associated protein	289	32123	5	7	0	20%
Q9ULW0	Targeting protein for Xklp2	747	85582	5	7	1	7%
P62753	40S ribosomal protein S6	249	28645	4	34	0	13%
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa), isoform CRA_e	306	32796	4	31	0	12%
D6R9P3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	280	30266	4	27	0	15%
Q15424	Isoform 2 of Scaffold attachment factor B1	848	95105	4	26	0	4%
P46782	40S ribosomal protein S5	204	22844	4	25	1	18%
P61769	Beta-2-microglobulin	119	13688	4	25	0	35%
F5H018	GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment)	199	22503	4	25	0	23%
P13674	Isoform 3 of Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	516	58903	4	25	0	10%
J3QT28	Mitotic checkpoint protein BUB3 (Fragment)	278	31666	4	24	0	16%
B4DJQ5	cDNA FLJ59211, highly similar to Glucosidase 2 subunit beta	535	60078	4	22	0	10%
A8K666	cDNA FLJ75460, highly similar to Homo sapiens phenylalanine-tRNA synthetase-like, beta subunit, mRNA	589	65984	4	22	0	7%
Q9BTQ7	Similar to ribosomal protein L23 (Fragment)	134	14123	4	22	0	34%
P25398	40S ribosomal protein S12	132	14488	4	21	4	33%
Q0D2M2	HIST1H2BC protein	126	13808	4	21	0	31%
P07741	Isoform 2 of Adenine phosphoribosyltransferase	134	14530	4	21	0	38%
P30048	Isoform 2 of Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	238	25804	4	21	0	19%
Q53HC2	Peroxioredoxin 3 isoform a variant (Fragment)	256	27589	4	21	0	18%
Q969G5	Protein kinase C delta-binding protein	261	27667	4	21	0	16%
P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	256	27657	4	21	0	18%
A8K0T9	Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, alpha 1, isoform CRA_a	286	32884	4	19	0	20%
P31689	Isoform 2 of DnaJ homolog subfamily A member 1	331	37003	4	19	0	20%
P62316	Isoform 2 of Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	108	12373	4	19	0	35%
Q13242	Serine/arginine-rich splicing factor 9	221	25508	4	19	4	19%
Q9NR30	Isoform 2 of Nucleolar RNA helicase 2	715	79589	4	18	0	7%
P61026	Ras-related protein Rab-10	200	22509	4	18	4	15%

Q15717	ELAV-like protein 1	326	36051	4	17	0	15%
Q6NVW7	Importin subunit alpha	529	57911	4	17	0	9%
V9HW41	Epididymis secretory protein Li 71	152	17109	4	16	0	32%
Q16658	Fascin	493	54478	4	16	1	9%
O75494	Isoform 5 of Serine/arginine-rich splicing factor 10	165	20087	4	16	0	30%
HOYHC3	Nucleosome assembly protein 1-like 1 (Fragment)	198	23385	4	16	0	29%
O95782	AP-2 complex subunit alpha-1	977	107460	4	15	0	5%
B3KP14	cDNA FLJ30937 fis, clone FEBRA2007247, highly similar to G-rich sequence factor 1	412	46648	4	15	0	12%
P68036	Isoform 2 of Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	122	14094	4	15	0	49%
Q96TA1	Niban-like protein 1	746	84067	4	15	0	7%
Q9Y266	Nuclear migration protein nudC	331	38201	4	15	4	9%
D6RDA2	Protein DEK (Fragment)	122	14130	4	15	0	32%
B3KY12	cDNA FLJ46581 fis, clone THYMU3043200, highly similar to Splicing factor 3A subunit 3	501	58722	4	14	0	10%
A2A2D0	Stathmin (Fragment)	86	9840	4	14	0	49%
Q99460	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	953	105766	4	13	0	5%
O95831	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	613	66841	4	13	0	9%
O43852	Calumenin	315	37066	4	13	1	12%
B7Z8X5	cDNA FLJ61541, highly similar to Homo sapiens PDZ and LIM domain 5 (PDLIM5), transcript variant 2, mRNA	483	52651	4	13	0	10%
E9PLT0	Cold shock domain-containing protein E1	668	74519	4	13	0	7%
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	1464	138839	4	13	2	2%
K7EK07	Histone H3 (Fragment)	132	14887	4	13	0	42%
Q08257	Quinone oxidoreductase	329	35167	4	13	0	19%
P46779	60S ribosomal protein L28	137	15720	4	12	0	27%
P30837	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	517	57152	4	12	4	10%
P15121	Aldose reductase	316	35813	4	12	0	10%
V9HW35	Epididymis secretory protein Li 55	162	17002	4	12	0	33%
E9PNR9	Protein arginine N-methyltransferase 1 (Fragment)	160	18267	4	12	0	29%
P55735	Protein SEC13 homolog	322	35500	4	12	0	19%
F6WQW2	Ran-specific GTPase-activating protein	278	31866	4	12	0	19%

Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	328	35775	4	11	4	13%
Q9Y3B3	Isoform 2 of Transmembrane emp24 domain-containing protein 7	188	21201	4	11	0	29%
Q04760	Lactoylglutathione lyase	184	20746	4	11	0	21%
P26885	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	142	15621	4	11	2	19%
I3L3C4	Ribosomal L1 domain-containing protein 1 (Fragment)	158	18505	4	11	0	27%
Q9Y3F4	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	350	38396	4	11	1	11%
P11766	Alcohol dehydrogenase class-3	374	39680	4	10	0	16%
B2R7G6	cDNA, FLJ93437, highly similar to Homo sapiens histidyl-tRNA synthetase-like (HARSL), mRNA	506	56835	4	10	0	8%
O75821	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	320	35571	4	10	1	11%
HOY8C6	Importin-5 (Fragment)	1099	123763	4	10	0	5%
Q15637	Isoform 4 of Splicing factor 1	548	59656	4	10	0	9%
Q16706	Alpha-mannosidase 2	1144	131039	4	9	0	5%
O94905	Erlin-2	339	37797	4	9	0	17%
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	1382	166450	4	9	0	4%
P46940	HCG1991735, isoform CRA_a	1657	189116	4	9	0	3%
P25205	Isoform 2 of DNA replication licensing factor MCM3	853	95830	4	9	0	5%
B9A041	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	210	23006	4	9	0	22%
P56192	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	900	101034	4	9	0	8%
P61160	Actin-related protein 2	394	44714	4	8	0	10%
Q10567	AP-1 complex subunit beta-1	949	104552	4	8	0	9%
P07686	Beta-hexosaminidase subunit beta	556	63053	4	8	0	8%
O75390	Citrate synthase, mitochondrial	466	51662	4	8	1	7%
P30084	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	290	31349	4	8	4	24%
Q8N766	ER membrane protein complex subunit 1	993	111671	4	8	0	7%
B4DJB4	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	316	34465	4	8	0	17%
Q9H2U2	Isoform 5 of Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	232	25957	4	8	0	21%
Q14165	Malectin	292	32196	4	8	1	12%
Q9NZM1	Myoferlin	2061	234543	4	8	1	2%
HOYIZ1	Niemann-Pick disease, type C2, isoform CRA_a	151	16542	4	8	0	28%

E1NZA1	Peroxisome proliferator activated receptor interacting complex protein	2671	292540	4	8	0	2%
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	1270	140851	4	7	1	4%
Q16531	DNA damage-binding protein 1	1140	126869	4	7	1	4%
Q6DEN2	DPYSL3 protein	684	73846	4	7	0	8%
P16435	NADPH--cytochrome P450 reductase	677	76623	4	7	0	10%
Q9BUQ8	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	820	95506	4	7	1	4%
K7EIV0	Calpain small subunit 1 (Fragment)	196	22066	4	6	0	29%
Q15185	Isoform 4 of Prostaglandin E synthase 3	139	16448	4	6	0	30%
P61081	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	183	20869	4	6	1	20%
Q09161	Nuclear cap binding protein subunit 1, 80kDa, isoform CRA_a	790	91763	4	6	0	8%
Q8TAT6	Nuclear protein localization protein 4 homolog	608	68059	4	6	1	7%
O95571	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial	254	27837	4	6	1	13%
P21281	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	511	56447	4	6	4	12%
P23229	Isoform 7 of Integrin alpha-6	954	106492	4	5	0	7%
Q86UE4	Protein LYRIC	582	63781	4	5	1	6%
B4DRX3	60S ribosomal protein L6	227	26039	4	4	0	22%
P62495	Isoform 2 of Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	404	45416	4	4	0	13%
P60866	40S ribosomal protein S20	119	13346	3	31	0	25%
P16402	Histone H1.3	221	22318	3	27	0	14%
P62263	40S ribosomal protein S14	151	16245	3	26	3	23%
B2R6F3	Serine/arginine-rich-splicing factor 3	95	10296	3	25	0	25%
Q14XT3	Cytochrome oxidase subunit II (Fragment)	122	13711	3	22	0	22%
F8VY04	Adenylate kinase 2, mitochondrial	190	21195	3	21	0	19%
P31942	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	297	31487	3	21	0	15%
Q9HB71	Isoform 3 of Calcyclin-binding protein	185	21197	3	20	0	14%
B7Z4E3	60S ribosomal protein L31	120	13929	3	19	0	20%
H0YD13	CD44 antigen	206	22651	3	19	0	17%
B4DUX0	cDNA FLJ60167, highly similar to Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase(EC 3.1.2.2)	265	29608	3	17	0	14%
Q08ES8	Cell growth-inhibiting protein 34	177	20064	3	17	0	18%

F8W1N5	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha (Fragment)	71	7790	3	17	0	59%
O95292	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	243	27193	3	17	0	16%
P60953	Cell division control protein 42 homolog	191	21227	3	16	0	24%
B3KMB7	Pyrroline-5-carboxylate reductase family, member 2, isoform CRA_a	212	22256	3	16	0	13%
P35637	RNA-binding protein FUS	526	53376	3	16	1	4%
P83731	60S ribosomal protein L24	157	17750	3	14	1	11%
P31146	Coronin-1A	461	50976	3	14	1	4%
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	338	35463	3	14	0	12%
Q6PIU2	Neutral cholesterol ester hydrolase 1	408	45761	3	14	0	10%
X6RFL8	Ras-related protein Rab-14 (Fragment)	181	20378	3	14	0	24%
Q7Z3K9	Splicing factor 3B subunit 2	871	97507	3	14	0	4%
P50914	60S ribosomal protein L14	215	23399	3	13	1	11%
Q6FG59	CDC37 protein	378	44407	3	13	0	12%
P33316	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	252	26529	3	13	0	15%
O94979	Isoform 5 of Protein transport protein Sec31A	509	56678	3	13	0	6%
A4UYK5	MHC class I antigen (Fragment)	181	20785	3	13	0	15%
P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	543	62581	3	13	0	8%
P08621	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	437	51508	3	13	0	6%
I3L3P7	40S ribosomal protein S15a	100	11452	3	12	0	31%
D6RB09	40S ribosomal protein S3a (Fragment)	194	22540	3	12	0	20%
Q59EI4	Copine I variant (Fragment)	517	56706	3	12	0	9%
V9HW92	Epididymis secretory protein Li 112	329	36031	3	12	0	12%
Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	72	7983	3	12	3	38%
P62633	Isoform 2 of Cellular nucleic acid-binding protein	170	18711	3	12	0	22%
P10599	Isoform 2 of Thioredoxin	85	9428	3	12	0	38%
Q8TAS6	LAMB1 protein (Fragment)	1083	118818	3	12	0	5%
Q15046	Lysine--tRNA ligase	597	67987	3	12	0	6%
P68402	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	229	25535	3	12	0	15%

M0R3D6	60S ribosomal protein L18a (Fragment)	141	16686	3	11	0	26%
B7Z592	cdNA FLJ61635, highly similar to Homo sapiens likely ortholog of mouse immediate early response, erythropoietin 4 (LEREPO4), mRNA	392	44845	3	11	0	9%
Q5JTV8	Isoform 3 of Torsin-1A-interacting protein 1	584	66261	3	11	0	7%
B7Z2R9	cdNA FLJ52540, highly similar to Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	300	32941	3	10	0	10%
Q9BR76	Coronin	489	54182	3	10	0	6%
O43237	Isoform 2 of Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	415	44959	3	10	0	10%
P50395	Isoform 2 of Rab GDP dissociation inhibitor beta	400	45572	3	10	0	11%
O60493	Isoform 4 of Sorting nexin-3	140	16287	3	10	0	17%
Q7Z5D5	Medulloblastoma antigen MU-MB-2.50 (Fragment)	384	43691	3	10	0	10%
Q9NX63	MICOS complex subunit MIC19	227	26118	3	10	1	8%
Q8TCT9	Minor histocompatibility antigen H13	377	41444	3	10	1	6%
O75475	PC4 and SFRS1-interacting protein	530	60049	3	10	0	9%
P49591	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	514	58722	3	10	0	6%
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	528	59088	3	10	3	6%
P84098	60S ribosomal protein L19	196	23433	3	9	0	17%
E7EMS6	Catechol O-methyltransferase (Fragment)	223	24804	3	9	0	21%
Q9H9J7	cdNA FLJ12692 fis, clone NT2RM4002623, weakly similar to ASPARTYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.12)	463	52588	3	9	0	7%
Q6PKC2	CROP protein (Fragment)	236	26981	3	9	0	17%
P28838	Cytosol aminopeptidase	519	56113	3	9	1	4%
P58335	Isoform 2 of Anthrax toxin receptor 2	386	42848	3	9	0	10%
O00560	Isoform 3 of Syntenin-1	292	31724	3	9	0	23%
P62266	40S ribosomal protein S23	143	15780	3	8	0	23%
J3KRX5	60S ribosomal protein L17 (Fragment)	169	19555	3	8	0	24%
F5H6I7	Atlastin-3	523	58718	3	8	0	6%
B2R7Y0	cdNA, FLJ93654, highly similar to Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (SERPINB2), mRNA	415	46563	3	8	3	9%
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	305	30804	3	8	3	12%

B4DII5	Importin subunit alpha	533	59585	3	8	0	8%
O94776	Metastasis associated 1 family, member 2, isoform CRA_a	668	74958	3	8	0	6%
P60660	Myosin light polypeptide 6	151	16901	3	8	0	20%
Q8TC12	Retinol dehydrogenase 11	318	35345	3	8	3	13%
D6RIU4	Vesicular integral-membrane protein VIP36 (Fragment)	192	21916	3	8	0	16%
P63173	60S ribosomal protein L38	70	8195	3	7	0	39%
E7EQ12	Calpastatin	423	46088	3	7	0	11%
Q9UNM1	Chaperonin 10-related protein (Fragment)	97	10271	3	7	0	32%
Q969X5	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	198	22128	3	7	0	21%
P42224	Isoform Beta of Signal transducer and activator of transcription 1-al	712	82973	3	7	0	6%
D3DVQ1	Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1, isofo	559	63484	3	7	0	9%
P24666	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	158	18013	3	7	0	20%
P52948	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96	1817	197439	3	7	1	2%
Q8WYJ5	Protein kinase C inhibitor-2	128	13891	3	7	0	41%
Q9UN86	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	482	54070	3	7	0	9%
C9JRH2	Regulator of chromosome condensation (Fragment)	230	24432	3	7	0	19%
Q13501	Sequestosome-1	440	47639	3	7	3	6%
B4DUR8	T-complex protein 1 subunit gamma	500	55621	3	7	0	7%
X6RJP6	Transgelin-2 (Fragment)	187	21055	3	7	0	27%
Q9Y3I0	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	505	55157	3	7	3	7%
Q8NI36	WD repeat-containing protein 36	895	99285	3	7	0	4%
B2RB23	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	394	41557	3	6	0	9%
P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1	599	67253	3	6	3	7%
P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	935	101477	3	6	1	3%
A5YKK6	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	2376	266750	3	6	1	1%
B4E2Z3	cDNA FLJ54090, highly similar to 4F2 cell-surface antigen heavy chain	511	55887	3	6	0	7%
Q14677	Clathrin interactor 1	625	68198	3	6	0	6%
O14579	Coatomer subunit epsilon	307	34470	3	6	0	16%
P33991	DNA replication licensing factor MCM4	863	96480	3	6	0	5%
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	4128	468770	3	6	3	1%

Q9NZN4	EH domain-containing protein 2	543	61105	3	6	1	5%
O14980	Exportin-1	1071	123288	3	6	3	4%
Q96GX3	KIAA0118 protein (Fragment)	175	19318	3	6	0	23%
P36776	Lon protease homolog, mitochondrial	959	106404	3	6	0	4%
O75694	Nucleoporin 155kDa, isoform CRA_a	1391	155082	3	6	0	3%
B7Z972	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	192	20652	3	6	0	18%
Q5W0J0	Ras-related protein Rab-18	161	17994	3	6	0	25%
Q08209	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	521	58632	3	6	0	5%
P55036	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	377	40693	3	5	0	10%
Q53GB3	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b isoform 1 variant (Fragment)	256	28800	3	5	0	14%
V9GYZ6	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase (Fragment)	968	108954	3	5	0	4%
J3QT54	Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 7 (Fragment)	205	22744	3	5	0	15%
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	1364	129054	3	5	0	3%
P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	445	52169	3	5	1	4%
Q53HU7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (Fragment)	325	36459	3	5	0	10%
Q9BVP2	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	549	61936	3	5	1	5%
D6RE99	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	78	8611	3	5	0	46%
A8K7T0	Kynureninase	465	52317	3	5	0	8%
Q5HYD9	Putative uncharacterized protein DKFZp686M0619 (Fragment)	107	11848	3	5	0	51%
P10301	Ras-related protein R-Ras	218	23448	3	5	0	14%
O75822	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	258	29027	3	4	1	9%
K7EL62	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 (Fragment)	236	27400	3	4	0	17%
Q9BUJ2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	856	95661	3	4	1	3%
Q9UIG0	Isoform 2 of Tyrosine-protein kinase BAZ1B	1479	170322	3	4	0	2%
P78406	mRNA export factor	368	40924	3	4	1	6%
O75400	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	957	108719	3	4	1	3%
P35251	Replication factor C subunit 1	1148	128157	3	4	0	3%

Q9P016	Thymocyte nuclear protein 1	225	25663	3	4	1	12%
S4R3Z2	Aldo-keto reductase family 1 member C3	300	34300	3	3	0	12%
E5RK69	Annexin	460	51726	3	3	3	7%
Q13619	Cullin-4A	759	87606	3	3	1	3%
P49790	Isoform 3 of Nuclear pore complex protein Nup153	1506	157222	3	3	0	3%
P53992	Protein transport protein Sec24C	1094	118231	3	3	0	3%
O75533	Splicing factor 3B subunit 1	1304	145720	3	3	3	2%
J3QLI9	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	75	8370	2	21	0	44%
C9J3L8	Translocon-associated protein subunit alpha	265	29537	2	19	0	9%
P61956	Isoform 2 of Small ubiquitin-related modifier 2	71	8088	2	15	0	31%
Q5T123	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	88	9357	2	15	0	28%
E9PJD9	60S ribosomal protein L27a	91	10103	2	14	0	23%
A6NLM8	Translocon-associated protein subunit delta	148	16217	2	14	0	20%
P62851	40S ribosomal protein S25	125	13716	2	13	2	15%
K7EJT5	60S ribosomal protein L22 (Fragment)	47	5062	2	13	0	51%
P61006	RAB8A, member RAS oncogene family, isoform CRA_a	207	23635	2	13	0	13%
E9PKD5	26S protease regulatory subunit 6A (Fragment)	311	34574	2	12	0	8%
P46778	60S ribosomal protein L21	160	18535	2	12	1	9%
B4DDL4	cDNA FLJ53966, moderately similar to Homo sapiens cytidylate kinase (CMPK)	181	20528	2	12	0	15%
C9JMM0	Chromobox protein homolog 3 (Fragment)	62	7199	2	12	0	32%
O75131	Copine III, isoform CRA_a	537	60074	2	12	0	3%
B4E1K8	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	451	52776	2	12	0	5%
Q96D15	Reticulocalbin-3	328	37452	2	12	2	8%
H7C131	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal (Fragment)	290	30299	2	11	0	11%
P30049	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	168	17461	2	11	2	14%
Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	784	85524	2	11	0	3%
E9PNW4	CD59 glycoprotein	108	11959	2	11	0	19%
Q14669	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	1992	220278	2	11	0	1%
P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	218	24546	2	11	0	11%
J3QS48	Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein	101	10953	2	11	0	24%
P49189	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	494	53749	2	10	0	5%
E5RI99	60S ribosomal protein L30 (Fragment)	114	12630	2	10	0	25%

C9JTK4	AP-2 complex subunit mu (Fragment)	160	18294	2	10	0	12%
B2RAH7	cDNA, FLJ94921, highly similar to Homo sapiens prolyl endopeptida	710	80664	2	10	0	4%
Q9UBG0	C-type mannose receptor 2	1479	166550	2	10	2	2%
Q14258	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	630	70910	2	10	0	4%
P67775	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	255	29698	2	10	0	9%
F6S6P2	Large proline-rich protein BAG6 (Fragment)	515	54618	2	10	0	4%
Q15005	Signal peptidase complex subunit 2	227	25056	2	10	0	9%
P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	380	39787	2	10	0	4%
Q9UEH5	24-kDa subunit of complex I (Fragment)	231	25396	2	9	0	10%
P62857	40S ribosomal protein S28	69	7818	2	9	0	17%
B3KVN0	cDNA FLJ16785 fis, clone NT2RI2015342, highly similar to Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	416	45821	2	9	0	4%
Q9UBS4	DnaJ homolog subfamily B member 11	358	40471	2	9	2	8%
Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59	307	34891	2	9	2	10%
A5D6X1	MAP1B protein (Fragment)	726	81891	2	9	0	4%
J3QQY2	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1	104	11347	2	9	0	22%
Q59GY3	Arginine/serine-rich splicing factor 6 variant (Fragment)	279	31828	2	8	0	6%
B4DDV4	cDNA FLJ52530, highly similar to Tumor protein D54	157	17148	2	8	0	15%
E5RHJ4	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2 (Fragment)	277	31053	2	8	0	10%
Q96CS3	FAS-associated factor 2	445	52573	2	8	2	5%
Q9UNZ2	Isoform 4 of NSFL1 cofactor p47	259	28487	2	8	0	8%
Q01130	Serine/arginine-rich splicing factor 2	221	25443	2	8	1	4%
P46783	40S ribosomal protein S10	165	18868	2	7	0	14%
P83881	60S ribosomal protein L36a	106	12415	2	7	0	16%
B5BUB5	Autoantigen La (Fragment)	408	46820	2	7	0	6%
X6R5C5	Carboxypeptidase	481	54203	2	7	0	6%
B4DJE7	cDNA FLJ52595, highly similar to Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.3.99.3)	232	25629	2	7	0	14%
B4DKJ4	cDNA FLJ57738, highly similar to Translationally-controlled tumor protein	142	16076	2	7	0	14%

Q86TY5	Galectin	121	13870	2	7	0	10%
O15042	Isoform 3 of U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	620	72461	2	7	0	6%
Q15102	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	231	25700	2	7	1	4%
H7BY36	RNA-binding protein EWS (Fragment)	308	32146	2	7	0	7%
Q05BU6	SFRS11 protein (Fragment)	246	24814	2	7	0	10%
E5RJR5	S-phase kinase-associated protein 1	163	18690	2	7	0	15%
B5MCW2	60S ribosomal protein L3 (Fragment)	272	31206	2	6	0	6%
Q6P587	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial	224	24809	2	6	0	13%
A0JLQ5	BXDC2 protein (Fragment)	335	39127	2	6	0	5%
P04040	Catalase	527	59701	2	6	2	5%
B4DU91	cDNA FLJ55368, highly similar to Epsin-1	536	55780	2	6	0	8%
K7EKW4	Isochorismatase domain-containing protein 2, mitochondrial (Fragment)	178	19378	2	6	0	28%
Q9Y680	Isoform 2 of Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP7	222	25760	2	6	0	10%
Q9UHX1	Isoform 6 of Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	513	55346	2	6	0	5%
H7COR7	NADH-cytochrome b5 reductase 1 (Fragment)	226	24873	2	6	0	8%
Q15843	NEDD8	81	9048	2	6	2	31%
B4E3T7	Nucleoporin 133kDa, isoform CRA_a	981	110429	2	6	0	4%
F8VZN8	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A (Fragment)	692	76469	2	6	0	5%
Q9UF24	Putative uncharacterized protein DKFZp586K0821 (Fragment)	190	22186	2	6	0	13%
Q5JV99	Serine/threonine-protein kinase 24 (Fragment)	142	15741	2	6	0	20%
J3KTL8	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1 (Fragment)	1388	155531	2	6	0	2%
Q2VEU0	Truncated mercaptopyruvate sulfurtransferase variant	84	9457	2	6	0	35%
O95336	6-phosphogluconolactonase	258	27512	2	5	2	9%
B4DM63	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	167	19031	2	5	0	12%
D3DPU2	Adenylyl cyclase-associated protein	475	51623	2	5	0	8%
P01023	Alpha-2-macroglobulin	1474	163170	2	5	2	1%
Q9ULA0	Aspartyl aminopeptidase	475	52377	2	5	0	5%
K7ES69	Calponin-2	148	16469	2	5	0	19%

P17676	CCAAT/enhancer-binding protein beta	345	36065	2	5	2	8%
B3KMK0	cdNA FLJ11217 fis, clone PLACE1008044, highly similar to NUCLEAR PORE COMPLEX PROTEIN NUP107	593	69144	2	5	0	4%
Q96K98	cdNA FLJ14414 fis, clone HEMBA1004847, highly similar to SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 68 KD PROTEIN	327	37175	2	5	0	11%
P46109	Crk-like protein	303	33738	2	5	2	4%
P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	169	19546	2	5	2	12%
Q96HY6	DDRKG domain-containing protein 1	314	35572	2	5	2	10%
B4DM30	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 38, isoform CRA_d	900	102102	2	5	0	3%
C9IZ01	Elongation factor G, mitochondrial	591	65975	2	5	0	5%
H3BS70	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial (Fragment)	224	24671	2	5	0	9%
Q96HE7	ERO1-like protein alpha	468	54340	2	5	0	5%
Q96BS4	FBL protein (Fragment)	260	28414	2	5	0	8%
P06756	Isoform 2 of Integrin alpha-V	1012	112169	2	5	0	3%
P50579	Isoform 2 of Methionine aminopeptidase 2	455	50460	2	5	0	5%
Q92900	Isoform 2 of Regulator of nonsense transcripts 1	1118	122940	2	5	0	2%
Q14203	Isoform p135 of Dynactin subunit 1	1144	127307	2	5	0	2%
P30419	Isoform Short of Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	416	48092	2	5	0	5%
F5GX77	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein	106	11946	2	5	0	25%
M0QXF7	Myeloid-derived growth factor (Fragment)	84	9649	2	5	0	20%
B1AH77	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	148	16747	2	5	0	15%
F8W727	Ribosomal protein L32, isoform CRA_a	135	15832	2	5	0	15%
P61009	Signal peptidase complex subunit 3	180	20283	2	5	1	7%
Q53G21	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A' variant (Fragment)	255	28438	2	5	0	12%
F8WF48	Translocation protein SEC62	85	9846	2	5	0	22%
K7ER18	Uncharacterized protein	161	17823	2	5	0	16%
B7Z7G7	Vacuolar protein sorting-associated protein 45	198	22962	2	5	0	13%
B2R856	Acyl-coenzyme A oxidase	700	77490	2	4	0	4%
E9PS97	Alpha-parvin (Fragment)	209	23587	2	4	0	13%

A8MU58	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	242	26725	2	4	0	8%
P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	2491	274181	2	4	0	1%
B3KRJ9	cDNA FLJ34439 fis, clone HLUNG2001146, highly similar to Splicing factor, arginine/serine-rich 12	514	58149	2	4	0	7%
B4DF38	cDNA FLJ52123, highly similar to Platelet-activating factor acetylhydrolase IB alpha	205	23384	2	4	0	13%
B7Z2E2	cDNA FLJ54671, highly similar to Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	567	62230	2	4	0	5%
B7Z238	cDNA FLJ55839, highly similar to Bcl-2-like 13 protein	361	38942	2	4	0	7%
B7Z601	cDNA FLJ57187, highly similar to Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.1.99.5)	500	55686	2	4	0	4%
B4DZ87	cDNA FLJ57240, highly similar to Mitochondrial proteins import receptor	501	56877	2	4	0	6%
B4DFQ5	cDNA FLJ58134, highly similar to Cleavage stimulation factor 77 kDa	625	72121	2	4	0	6%
B4DTW7	cDNA FLJ61400, highly similar to Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1	221	24099	2	4	0	8%
K7ENX8	Cold-inducible RNA-binding protein (Fragment)	80	8890	2	4	0	40%
Q9UBI1	COMM domain-containing protein 3	195	22119	2	4	2	12%
P07919	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	91	10714	2	4	1	20%
P30046	D-dopachrome decarboxylase	118	12686	2	4	0	19%
D5KJA2	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4 like 2A	140	15154	2	4	0	12%
F6RFD5	Dextrin	135	15369	2	4	0	16%
Q03001	Dystonin	7570	860109	2	4	1	0%
O75521	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	364	40140	2	4	0	8%
Q06787	Fragile X mental retardation protein 1	632	71113	2	4	0	3%
Q08380	Galectin-3-binding protein	585	65271	2	4	0	5%
Q9BZE4	Isoform 2 of Nucleolar GTP-binding protein 1	587	68212	2	4	0	6%
Q92626	Isoform 2 of Peroxidase homolog	727	80261	2	4	0	4%
Q9NW13	Isoform 2 of RNA-binding protein 28	618	69862	2	4	0	6%
Q9BQ52	Isoform 2 of Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2	501	56041	2	4	0	6%
P24468	Isoform 3 of COUP transcription factor 2	261	29126	2	4	0	12%

Q13492	Isoform 4 of Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	551	59863	2	4	0	6%
Q7Z434	Isoform 5 of Mitochondrial antiviral-signaling protein	124	14358	2	4	0	28%
C9JP00	Muscleblind-like protein 1	348	37856	2	4	0	8%
P55769	NHP2-like protein 1	128	14147	2	4	1	9%
O60568	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	738	84714	2	4	2	3%
Q86VS8	Protein Hook homolog 3	718	83056	2	4	1	2%
Q4ZG72	Putative uncharacterized protein DDX18 (Fragment)	546	61538	2	4	0	5%
P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	390	43250	2	4	0	6%
H3BP71	Ring finger protein 40, isoform CRA_a	1001	113591	2	4	0	3%
Q9H3N1	Thioredoxin-related transmembrane protein 1	280	31753	2	4	0	7%
F2Z2F3	Uncharacterized protein	143	15617	2	4	0	24%
P35998	26S protease regulatory subunit 7	433	48585	2	3	2	5%
P62269	40S ribosomal protein S18	152	17690	2	3	2	11%
P62854	40S ribosomal protein S26	115	12989	2	3	0	21%
P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	127	14368	2	3	0	19%
C9JVY5	A-kinase anchor protein 2 (Fragment)	778	85213	2	3	0	4%
E7EV99	Alpha-adducin	632	69994	2	3	0	6%
Q6NUK1	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	477	53302	2	3	0	6%
Q5U000	Cathepsin Z	303	33828	2	3	0	7%
B4DT97	cDNA FLJ56931, highly similar to Peroxisomal carnitine O-octanoyltransferase (EC 2.3.1.137)	457	51887	2	3	0	7%
B4DR88	cDNA FLJ58252, highly similar to Homo sapiens DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40 (DHX40), mRNA	631	72126	2	3	0	4%
B4E0J3	cDNA FLJ58965, highly similar to Nonspecific lipid-transfer protein (EC 2.3.1.176)	121	13013	2	3	0	16%
P10253	Glucosidase, alpha acid (Pompe disease, glycogen storage disease type II),	952	105253	2	3	0	3%
Q16836	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	314	34254	2	3	0	13%
Q9BT78	Isoform 2 of COP9 signalosome complex subunit 4	352	40154	2	3	0	10%
O60271	Isoform 3 of C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	945	104654	2	3	0	4%

P30154	Isoform 5 of Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	474	52162	2	3	0	6%
O15460	Isoform IIa of Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	533	60577	2	3	0	4%
Q6PKG0	La-related protein 1	1096	123416	2	3	1	1%
Q02790	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	459	51754	2	3	2	7%
Q32P42	RAD50 protein (Fragment)	723	83985	2	3	0	5%
H0YL43	Reticulocalbin-2 (Fragment)	155	17694	2	3	0	22%
Q9BXP5	Serrate RNA effector molecule homolog	876	100586	2	3	1	1%
D6RDY6	Signal recognition particle subunit SRP72 (Fragment)	357	39625	2	3	0	10%
B4DY87	Succinyl-CoA ligase subunit beta	329	36008	2	3	0	12%
H3BQQ9	SUMO-conjugating enzyme UBC9 (Fragment)	137	15488	2	3	0	27%
Q3B7X1	TMX3 protein (Fragment)	423	48510	2	3	0	4%
B9EG90	Topoisomerase (DNA) I	765	90625	2	3	2	2%
C9JJK5	Zyxin (Fragment)	171	19040	2	3	0	13%
P42677	40S ribosomal protein S27	84	9437	2	2	2	23%
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	213	23245	2	2	0	12%
Q9Y6D5	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	1785	201891	2	2	2	1%
F5GXJ9	CD166 antigen	532	59473	2	2	0	4%
B4E2Y4	cDNA FLJ52462, moderately similar to Mus musculus proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8 (Psm8), mRNA	217	23815	2	2	0	11%
B4DWB5	cDNA FLJ53931, highly similar to Bifunctional 3'-phosphoadenosine5'-phosphosulfate synthetase 2	618	69970	2	2	0	6%
B4DRW8	cDNA FLJ54537, highly similar to Homo sapiens pitrilysin metalloproteinase 1 (PITRM1), mRNA	972	109691	2	2	0	5%
B4DVK5	cDNA FLJ54759, highly similar to DNA replication licensing factor MCM5	412	44934	2	2	0	6%
A8K559	cDNA FLJ76187	469	51070	2	2	0	9%
B2R9I9	cDNA, FLJ94417, highly similar to Homo sapiens WD repeat domain 57 (U5 snRNP specific) (WDR57), mRNA	357	39224	2	2	0	12%
Q6FHJ9	COX5B protein (Fragment)	129	13670	2	2	0	22%
O75165	DnaJ homolog subfamily C member 13	2243	254234	2	2	0	1%

X6R9L0	DnaJ homolog subfamily C member 3	453	51861	2	2	0	5%
Q6I9R8	FHL2 protein	279	32153	2	2	0	9%
G3V1U5	Golgi transport 1 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>), isoform CRA_c	74	8191	2	2	0	20%
Q93020	GTP-binding regulatory protein Gi alpha-2 chain (Fragment)	197	22068	2	2	0	14%
P05556	Integrin beta-1	798	88339	2	2	1	3%
Q27J81	Inverted formin-2	1249	135522	2	2	0	2%
Q8NE71	Isoform 2 of ATP-binding cassette sub-family F member 1	807	91606	2	2	0	3%
P98082	Isoform 2 of Disabled homolog 2	552	58807	2	2	0	4%
O00754	Isoform 2 of Lysosomal alpha-mannosidase	1010	113526	2	2	0	3%
Q9NUJ1	Isoform 2 of Mycophenolic acid acyl-glucuronide esterase, mitochondrial	149	16881	2	2	0	17%
P60174	Isoform 2 of Triosephosphate isomerase	249	26635	2	2	0	11%
Q9BWS9	Isoform 3 of Chitinase domain-containing protein 1	362	41633	2	2	0	9%
Q8IVF2	Isoform 3 of Protein AHNAK2	5695	605250	2	2	0	0%
Q16222	Isoform 3 of UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	521	58627	2	2	0	4%
Q5CZ91	Methionine aminopeptidase 1	336	37780	2	2	0	11%
P49821	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	464	50767	2	2	0	9%
Q15818	Neuronal pentraxin-1	432	47075	2	2	2	4%
Q6P1J9	Parafibromin	531	60521	2	2	2	5%
Q15067	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	660	74358	2	2	0	7%
F5GYR3	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase (Fragment)	275	30533	2	2	0	7%
Q6MZL5	Putative uncharacterized protein DKFZp686C06243 (Fragment)	1694	195507	2	2	0	1%
Q9Y3A5	Ribosome maturation protein SBDS	250	28828	2	2	0	7%
P49756	RNA-binding protein 25	843	100106	2	2	0	2%
O94804	Serine/threonine-protein kinase 10	968	112047	2	2	2	2%
Q96QD8	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	506	55972	2	2	1	3%
H3BMS6	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial (Fragment)	181	20025	2	2	0	15%
Q15370	Transcription elongation factor B polypeptide 2	118	13107	2	2	1	11%
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	2136	244335	2	2	2	2%

Q16270	Insulin-like growth factor binding protein 7, isoform CRA_a (Fragment)	194	20320	1	10	0	7%
P62847	40S ribosomal protein S24	132	15325	1	9	0	9%
A7YDK7	Aryl hydrocarbon receptor interacting protein (Fragment)	50	5484	1	9	0	28%
B4DL61	cDNA FLJ60291	355	39870	1	9	0	4%
BOQZK4	Heterochromatin protein 1-binding protein 3 (Fragment)	253	28479	1	9	0	4%
A0FGR8	Isoform 4 of Extended synaptotagmin-2	527	59348	1	9	0	3%
I4AY87	Macrophage migration inhibitory factor (Fragment)	115	12450	1	9	0	8%
Q5VU77	Ubiquitin-associated protein 2-like (Fragment)	350	37920	1	9	0	3%
P30043	Flavin reductase (NADPH)	206	22087	1	8	0	7%
P62318	Isoform 2 of Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	120	13265	1	8	0	8%
Q5QTQ6	MSTP010	216	24619	1	8	0	5%
Q96RX5	NADH ubiquinone oxidoreductase PDSW subunit (RH 16p13.3) (Fragment)	43	5063	1	8	0	33%
P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	491	55469	1	8	0	4%
H0YJH9	Polyadenylate-binding protein 2 (Fragment)	96	11060	1	8	0	11%
Q13404	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	147	16466	1	8	0	7%
P05386	60S acidic ribosomal protein P1	114	11489	1	7	0	14%
Q1JUQ3	FK506 binding protein12	37	3945	1	7	0	35%
Q8NF45	FLJ00353 protein (Fragment)	1766	200198	1	7	0	1%
O60763	General vesicular transport factor p115	962	107810	1	7	0	1%
Q8WYA6	Isoform 3 of Beta-catenin-like protein 1	311	36062	1	7	0	3%
F8W114	La-related protein 4 (Fragment)	125	14116	1	7	0	10%
H0YFI1	Ragulator complex protein LAMTOR1 (Fragment)	79	8687	1	7	0	16%
P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	136	14543	1	7	0	10%
J3QLE5	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N (Fragment)	169	17517	1	7	0	5%
Q8WVX7	40S ribosomal protein S19	71	7808	1	6	0	13%
K7EQ02	DAZ-associated protein 1 (Fragment)	327	34980	1	6	0	5%
Q53F47	Down-regulator of transcription 1 variant (Fragment)	176	19442	1	6	0	7%
Q9NP97	Dynein light chain roadblock-type 1	96	10897	1	6	0	12%
Q6IBU0	EIF5 protein	431	49103	1	6	0	2%
V9HWK2	Epididymis luminal protein 114	1134	123704	1	6	0	2%

Q5PXD5	Golgi matrix protein GM130 (Fragment)	194	21997	1	6	0	5%
Q9BWF4	MCM2 protein (Fragment)	362	41220	1	6	0	2%
H0YB37	Tetratricopeptide repeat protein 1 (Fragment)	163	18872	1	6	0	6%
H7C2P7	39S ribosomal protein L23, mitochondrial (Fragment)	118	13756	1	5	0	8%
R4GMT0	Alpha-centractin	332	37392	1	5	0	5%
B4DF22	cDNA FLJ55615, highly similar to SWI/SNF-related matrix-associatedactin-dependent regulator of chromatin subfamily C member 2	1019	112125	1	5	0	2%
B2R858	cDNA, FLJ93750, Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6 (DDX6), mRNA	472	53165	1	5	0	2%
B2R8A2	cDNA, FLJ93804, highly similar to Homo sapiens gp25L2 protein (HS	214	25044	1	5	0	5%
Q6NYC8	Isoform 2 of Phostensin	377	42789	1	5	0	5%
Q7Z7H5	Isoform 3 of Transmembrane emp24 domain-containing protein 4	186	20750	1	5	0	6%
F5H4Q0	Nesprin-1	477	54667	1	5	0	3%
B7Z478	Proteasome subunit beta type-2	84	9533	1	5	0	13%
C9J0T6	Ras-related protein Rab-17 (Fragment)	130	14521	1	5	0	10%
U3KQT1	S-formylglutathione hydrolase (Fragment)	120	13086	1	5	0	15%
B3KMI3	Spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome), isoform CRA_b	440	48773	1	5	0	7%
P63220	40S ribosomal protein S21	83	9088	1	4	0	11%
Q5T1M7	60 kDa U4/U6 snRNP-specific spliceosomal protein	521	58266	1	4	0	2%
H0YJ63	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 (Fragment)	90	10120	1	4	0	24%
C9JQQ5	Atlastin-2 (Fragment)	175	20269	1	4	0	9%
B3KM81	cDNA FLJ10471 fis, clone NT2RP2000045, highly similar to Dnal homolog subfamily A member 3, mitochondrial	453	49534	1	4	0	4%
Q9Y295	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	367	40499	1	4	1	4%
M0QX71	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1 (Fragment)	228	25443	1	4	0	7%
P31153	Isoform 2 of S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	299	32926	1	4	0	5%
Q9BV79	Isoform 2 of Trans-2-enoyl-CoA reductase, mitochondrial	297	32190	1	4	0	4%
P23381	Isoform 2 of Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	430	48802	1	4	0	4%

P06730	Isoform 3 of Eukaryotic translation initiation factor 4E	237	27225	1	4	0	5%
O15260	Isoform 3 of Surfeit locus protein 4	128	14827	1	4	0	10%
K7EIU4	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2 (Fragment)	221	24034	1	4	0	6%
Q8N1G4	Leucine rich repeat containing 47, isoform CRA_a	583	63416	1	4	0	3%
E9PMP7	LIM domain only protein 7 (Fragment)	1046	119435	1	4	0	2%
Q0ZAJ1	MSH2-Ex5 isoform (Fragment)	101	11671	1	4	0	14%
E7ETM8	Nexilin (Fragment)	321	38348	1	4	0	3%
E9PIN3	Nuclear RNA export factor 1 (Fragment)	603	68047	1	4	0	2%
F5H7R9	Parathyrosin (Fragment)	57	6232	1	4	0	19%
Q9HBR7	Propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide, isoform CRA_a	302	32838	1	4	0	5%
Q96C90	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B	147	15883	1	4	0	9%
Q9NSY5	Putative uncharacterized protein DKFZp434L1613	144	16470	1	4	0	9%
J3QLC6	Ras-related protein Rab-34, isoform NARR (Fragment)	156	17456	1	4	1	8%
Q5TEJ7	Replication protein A 32 kDa subunit (Fragment)	179	19403	1	4	0	9%
Q9GZT3	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	109	12323	1	4	0	13%
C9JR83	Structural maintenance of chromosomes protein 4 (Fragment)	423	48282	1	4	0	4%
Q6PJT7	Zinc finger CCCH domain-containing protein 14 (Fragment)	148	16761	1	4	0	11%
B3KY60	cDNA FLJ16777 fis, clone BRHIP2029567, highly similar to Cell division cycle 5-like protein	802	92202	1	3	0	1%
B3KXF9	cDNA FLJ45348 fis, clone BRHIP3011269, weakly similar to Prenylcysteine oxidase (EC 1.8.3.5)	376	42424	1	3	0	3%
A8K3Y5	cDNA FLJ78186	379	43578	1	3	0	4%
Q8IYN5	CKAP5 protein	953	106880	1	3	0	1%
K7EJ83	Cyclin-dependent kinase 3 (Fragment)	213	24409	1	3	0	7%
H7C044	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (Fragment)	226	24774	1	3	1	8%
Q86X76	Isoform 6 of Nitrilase homolog 1	243	26291	1	3	0	7%
Q7Z4H8	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 2, isoform CRA_a	507	58517	1	3	0	3%

Q9HAN9	Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase 1	279	31895	1	3	0	4%
E5RJY1	Protein NDRG1	103	10954	1	3	0	14%
H3BS02	[3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase [lipoamide]] kinase, mitochondrial	217	24415	1	2	0	5%
HOYJC0	26S protease regulatory subunit 10B (Fragment)	262	29618	1	2	0	5%
HOY9R4	60S ribosomal protein L9 (Fragment)	91	10134	1	2	0	11%
D6RHC4	Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1 (Fragment)	368	37483	1	2	0	5%
Q8N8U9	BMP-binding endothelial regulator protein	685	75927	1	2	0	3%
B7Z2X4	cDNA FLJ53327, highly similar to Gelsolin	705	77723	1	2	0	2%
B4E1E2	cDNA FLJ61530, highly similar to Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	661	74790	1	2	0	2%
G5E9W3	Cleavage and polyadenylation specific factor 3, 73kDa, isoform CRA_b	647	73412	1	2	0	2%
P02671	Fibrinogen alpha chain	866	94896	1	2	0	1%
P41250	Glycine--tRNA ligase	739	83095	1	2	0	2%
K7EMR1	Granulins (Fragment)	172	18039	1	2	0	9%
B4DWV5	GrpE protein homolog	196	21869	1	2	0	6%
P11532	Isoform 2 of Dystrophin	2341	270854	1	2	0	1%
Q15648	Isoform 2 of Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1	556	61506	1	2	0	2%
Q9Y570	Isoform 2 of Protein phosphatase methylesterase 1	199	22429	1	2	0	6%
Q9UNW1	Isoform 3 of Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1	284	31437	1	2	0	4%
Q9BRP4	Isoform 3 of Proteasomal ATPase-associated factor 1	277	29945	1	2	0	4%
C9JHF5	Mitochondrial fission factor (Fragment)	138	15599	1	2	0	20%
Q9NV56	MRG/MORF4L-binding protein	204	22385	1	2	1	6%
Q9H6R4	Nucleolar protein 6	200	22172	1	2	0	8%
Q53SY7	Putative uncharacterized protein CAD (Fragment)	2151	235011	1	2	0	1%
Q68DX9	Putative uncharacterized protein DKFZp686M05161	1267	142467	1	2	0	2%
K7ERJ1	Thymidine kinase (Fragment)	187	20495	1	2	0	10%

Anexo Tabela 2 : Proteínas totais identificadas por MS/MS nas amostras PGLTB-M

Cod. Uniprot	Identificação	Comprimento Proteína (#AA)	Peso Molecular (Da)	Número de Peptídeos	Número de Espectros	Peptídeos únicos	Cobertura
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	5890	628681,4	117	588	117	27%
P21333	Filamin-A	2647	280545,9	100	606	8	49%
Q15149	Isoform 2 of Plectin	4574	518138,6	97	419	9	22%
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	3177	343438,8	59	360	3	22%
O43707	Alpha-actinin-4	911	104770,5	44	342	28	47%
Q14315	Filamin-C	2725	290822,6	44	183	2	21%
Q13813	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	2472	284346,2	36	134	1	18%
P08670	Vimentin	466	53601,1	36	298	2	59%
Q00610	Clathrin heavy chain 1	1675	191474,5	32	144	2	25%
P13639	Elongation factor 2	858	95258,9	32	217	32	32%
P35579	Myosin-9	1960	226373,6	32	164	2	20%
P02545	Prelamin-A/C	664	74076,7	31	220	2	42%
P07237	Protein disulfide-isomerase	508	57062,7	28	228	3	49%
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	364	39377,3	27	175	3	75%
P14618	Pyruvate kinase PKM	531	57882	27	213	1	48%
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	654	72270,4	26	217	0	45%
P06733	Alpha-enolase	434	47121,3	24	304	3	49%
O75369	Filamin-B	2602	277972	23	82	1	11%
P30101	Protein disulfide-isomerase A3	505	56728,7	22	156	2	47%
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	910	101915,5	22	90	1	29%
Q01082	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	2364	274420,7	20	55	3	9%
P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	806	89247,7	20	109	1	32%
P60709	Actin, cytoplasmic 1	375	41691,7	18	151	1	44%
P07355	Annexin A2	339	38561,8	18	145	1	53%
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	462	50091,1	18	107	4	27%
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	335	36012,4	18	129	3	50%
P49327	Fatty acid synthase	2511	273236,3	17	59	17	9%
Q99798	Aconitate hydratase, mitochondrial	780	85353,9	16	54	3	23%
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	463	50926,4	16	96	1	44%

P26038	Moesin	577	67759,8	16	101	4	20%
Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1	2115	238097,2	16	43	4	8%
P19338	Nucleolin	710	76550,3	16	83	1	24%
Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	440	48073,3	16	92	1	47%
A3RJH1	ATP-dependent RNA helicase DDX1	740	82361,7	15	61	0	23%
B5BUE6	ATP-dependent RNA helicase DDX5 (Fragment)	614	69059,7	15	91	0	24%
P13667	Protein disulfide-isomerase A4	645	72869	15	86	2	22%
P50454	Serpin H1	418	46393,2	15	137	0	34%
Q9NYG1	Caldesmon 1, isoform CRA_b	481	56410,6	14	62	0	30%
B7ZAF0	cDNA, FLJ79164, highly similar to Tubulin beta-7 chain	415	46518,5	14	159	0	37%
Q9ULV4	Coronin-1C	474	53197,1	14	82	2	24%
P04843	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	607	68508,8	14	63	2	23%
P14625	Endoplasmin	803	92393,3	14	54	1	18%
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3	894	95261,1	14	52	3	14%
P51659	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	736	79618,3	14	53	1	24%
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	417	44568,1	14	112	3	34%
Q9UHD8	Septin-9	586	65342,8	14	52	3	19%
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	451	50085,6	14	115	2	37%
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform	263	29561	13	87	2	31%
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	573	60998,4	13	76	2	28%
P26641	Elongation factor 1-gamma	437	50069,1	13	71	2	22%
Q6PUJ7	Epididymis luminal protein 215	272	29783,9	13	84	0	46%
P34897	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	504	55939,7	13	81	1	29%
P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	707	76083,6	13	65	1	19%
P23396	40S ribosomal protein S3	243	26653,4	12	71	12	47%
P12109	Collagen alpha-1(VI) chain	1028	108444	12	45	4	12%
P02751	Fibronectin	2386	262442,1	12	24	3	5%
Q92598	Heat shock protein 105 kDa	858	96785,6	12	37	1	18%
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, isoform CRA_c	353	37388,7	12	85	0	36%
Q96QV6	Histone H2A type 1-A	131	14206,9	12	80	1	37%
P06753	Isoform 2 of Tropomyosin alpha-3 chain	248	28996,7	12	85	1	35%

Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB	944	106788,6	12	65	1	12%
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	1410	152362,7	12	21	3	8%
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	1023	112805,9	12	44	1	14%
Q9Y490	Talin-1	2541	269581	12	27	12	6%
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	553	59695,6	11	71	0	21%
B4DWL1	cDNA FLJ59240, highly similar to Far upstream element-binding protein 1	642	69789,5	11	65	0	16%
P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial	452	49492,2	11	40	11	27%
V9HWJ0	Epididymis secretory sperm binding protein Li 164nA	944	106788,6	11	64	0	12%
P63244	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	317	35036,5	11	27	3	33%
P30041	Peroxiredoxin-6	224	25001,2	11	60	1	48%
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1	531	57167,6	11	56	2	26%
P51149	Ras-related protein Rab-7a	207	23456,8	11	63	11	52%
P05388	60S acidic ribosomal protein P0	317	34233,8	10	72	0	48%
P08758	Annexin A5	320	35896,4	10	59	1	35%
B2RDX5	cDNA, FLJ96812, highly similar to Homo sapiens threonyl-tRNA synthetase (TARS), mRNA	711	82043,2	10	42	0	16%
P00367	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	558	61341,2	10	47	1	21%
P48643	Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit epsilon	448	49476,8	10	50	0	33%
P22314	Isoform 2 of Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	1018	113710,3	10	43	0	15%
P13797	Isoform 3 of Plastin-3	585	65572,8	10	44	0	22%
J3KPX7	Prohibitin-2	298	33200,9	10	60	0	39%
A5PLK7	RCC2 protein (Fragment)	457	49629,1	10	43	0	25%
Q13263	Transcription intermediary factor 1-beta	835	88475,4	10	46	1	20%
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6	609	69781	10	38	1	16%
P62258	14-3-3 protein epsilon	255	29137,4	9	56	1	33%
P08865	40S ribosomal protein SA	295	32815,4	9	66	1	34%
P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	968	106725,2	9	29	1	11%
P04083	Annexin A1	346	38672	9	39	1	28%
Q0QEN7	ATP synthase subunit beta (Fragment)	445	48065	9	75	0	27%
B5BTY4	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	640	70778,1	9	34	0	16%
P31939	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	592	64557,3	9	39	1	18%

V9HW96	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (Beta), isoform CRA_b	535	57434,1	9	36	0	25%
G3V1A4	Cofilin 1 (Non-muscle), isoform CRA_a	149	16782,8	9	64	0	56%
P29692	Elongation factor 1-delta	281	31084,8	9	55	0	38%
V9HWC2	Epididymis secretory sperm binding protein Li 67p	189	19860,5	9	37	0	61%
Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	1599	175364,3	9	21	2	5%
Q92945	Far upstream element-binding protein 2	711	73052	9	57	1	16%
P09382	Galectin-1	135	14688,2	9	70	9	66%
Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1	999	111248,2	9	44	1	11%
P50990	Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit theta	529	57590,4	9	44	0	19%
P42167	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	454	50621,4	9	54	1	24%
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	332	36647,4	9	62	1	29%
P43243	Matrin-3	847	94546,8	9	50	0	13%
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	216	23709,5	9	74	1	30%
Q06830	Peroxiredoxin-1	199	22078,3	9	61	6	51%
P62136	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	330	37469,8	9	55	4	31%
P50991	T-complex protein 1 subunit delta	539	57869,8	9	33	2	16%
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	432	47580,7	9	42	2	16%
P30050	60S ribosomal protein L12	165	17789,5	8	71	8	55%
P61158	Actin-related protein 3	418	47323	8	36	1	25%
P27824	Calnexin	592	67507,8	8	31	2	11%
P07858	Cathepsin B	339	37778,8	8	24	1	29%
E9KL44	Epididymis tissue sperm binding protein Li 14m	763	82928,9	8	43	0	16%
P63241	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	154	16803,4	8	61	1	36%
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	633	70881,2	8	48	1	13%
P09429	High mobility group protein B1	215	24860,2	8	40	1	27%
P12268	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	514	55751,6	8	34	1	14%
P52272	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	691	73554,4	8	42	0	15%
P06748	Isoform 2 of Nucleophosmin	265	29428,2	8	59	0	26%
P55084	Isoform 2 of Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	452	48830,2	8	41	0	19%

Q8NC51	Isoform 3 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	393	43091,5	8	26	8	29%
P11940	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1, isoform CRA_c	419	47286,8	8	48	0	22%
O00469	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	737	84613,6	8	37	1	11%
P38159	RNA-binding motif protein, X chromosome	391	42288,3	8	27	8	19%
Q00341	Vigilin	1268	141350,1	8	28	1	8%
P62280	40S ribosomal protein S11	158	18401	7	24	7	33%
P62241	40S ribosomal protein S8	208	24172,2	7	32	1	36%
P61254	60S ribosomal protein L26	145	17229,5	7	28	1	29%
O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	300	34293,5	7	19	2	21%
P23526	Adenosylhomocysteinase	432	47667,2	7	33	7	19%
B7Z5J7	cDNA FLJ58682, highly similar to Vesicle-fusing ATPase (EC 3.6.4.6)	739	81987,8	7	36	0	11%
A8K6Y1	cDNA FLJ75526, highly similar to Homo sapiens proliferation-associated 2G4, 38kDa (PA2G4), mRNA (Fragment)	367	40867,7	7	60	0	21%
A8K6Q8	cDNA FLJ75881, highly similar to Homo sapiens transferrin receptor (p90, CD71) (TFRC), mRNA	760	84801,9	7	32	0	11%
B2RBR9	cDNA, FLJ95650, highly similar to Homo sapiens karyopherin (importin) beta 1 (KPNB1), mRNA	876	97104	7	28	0	10%
P53621	Coatomer subunit alpha	1224	138239,9	7	35	1	7%
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	1464	138838,6	7	18	4	5%
B4DFL1	Dihydrolipoyl dehydrogenase	459	48850,3	7	25	0	18%
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	406	46106,5	7	35	1	17%
Q99832	Isoform 3 of T-complex protein 1 subunit eta	499	54751,5	7	20	0	21%
P22234	Multifunctional protein ADE2	425	47031,1	7	29	1	18%
P31040	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	664	72627,3	7	36	1	12%
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta	531	57969,6	7	12	2	12%
P02786	Transferrin receptor protein 1	760	84799,9	7	32	0	11%
P46782	40S ribosomal protein S5	204	22844	6	32	2	19%
P62424	60S ribosomal protein L7a	266	29959	6	28	6	22%
O15143	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	372	40905,4	6	20	1	19%
P05141	ADP/ATP translocase 2	298	32813,1	6	21	0	23%

B3KSC3	cDNA FLJ35987 fis, clone TESTI2014269, highly similar to D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	499	52961,4	6	35	0	16%
B7Z4L7	cDNA FLJ59035, highly similar to RNA-binding region-containing protein 2	337	36423,4	6	19	0	22%
Q53FB0	Chloride intracellular channel protein (Fragment)	241	26979,8	6	35	0	36%
P31930	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	480	52594,4	6	28	6	16%
P38117	Electron transfer flavoprotein subunit beta	255	27808,1	6	31	0	23%
V9HW43	Epididymis secretory protein Li 102	205	22750,5	6	42	0	40%
Q6FHU2	Epididymis secretory protein Li 35 (Fragment)	254	28767,8	6	39	0	32%
Q13838	HCG2005638, isoform CRA_a	428	48941,9	6	34	0	14%
E9PCY7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	429	47039,4	6	52	0	21%
Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	825	90510	6	20	1	7%
Q13200	Isoform 2 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	749	82122,7	6	19	0	9%
P52209	Isoform 2 of 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	470	51821,2	6	31	0	17%
P48735	Isoform 2 of Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	400	45132,8	6	36	0	18%
P60174	Isoform 2 of Triosephosphate isomerase	249	26634,7	6	24	0	40%
Q16881	Isoform 7 of Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	461	50823,9	6	21	0	16%
Q86UP2	Kinectin	1357	156161,3	6	12	2	4%
P42704	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	1394	157787,1	6	13	0	5%
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	338	35462,7	6	27	1	21%
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	1014	112994,4	6	20	2	5%
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1	356	37455,9	6	41	1	18%
B7Z972	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	192	20651,6	6	14	0	36%
Q96PK6	RNA-binding protein 14	669	69430,9	6	15	6	8%
F5GY03	SPARC (Fragment)	149	17440,5	6	26	0	40%
P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	543	62581,4	6	26	2	9%
Q9Y2W1	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	955	108583	6	7	6	6%
Q9Y4P3	Transducin beta-like protein 2	447	49748,2	6	13	2	14%
O60701	UDP-glucose 6-dehydrogenase	494	54971,2	6	19	6	18%
Q53GN4	WD repeat domain 1, isoform CRA_a (Fragment)	606	66119,8	6	24	0	11%

Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	261	26888,1	5	30	5	35%
P25398	40S ribosomal protein S12	132	14487,5	5	36	5	39%
P15880	40S ribosomal protein S2	293	31286,6	5	21	1	12%
P62753	40S ribosomal protein S6	249	28645	5	44	1	13%
P62081	40S ribosomal protein S7	194	22095,2	5	13	5	26%
P46777	60S ribosomal protein L5	297	34322,7	5	17	2	13%
P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	427	45152,6	5	21	5	14%
F8WDD7	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	113	13031	5	35	0	51%
P15144	Aminopeptidase N	967	109452,9	5	10	1	6%
P14868	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic	501	57082	5	14	1	11%
P27797	Calreticulin	417	48093,8	5	16	2	8%
O43852	Calumenin	315	37065,5	5	18	1	16%
A8K0T9	Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, alpha 1, isoform CRA_a	286	32884,3	5	14	0	27%
Q14444	Caprin-1	649	72692,7	5	38	0	8%
P16152	Carbonyl reductase [NADPH] 1	277	30337,9	5	17	1	17%
B3KVX6	cDNA FLJ41699 fis, clone HCHON2004776, highly similar to Homo sapiens cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4), mRNA	521	58097,8	5	13	0	13%
B4DPZ5	cDNA FLJ53495, highly similar to Polymerase I and transcript release factor	363	40441,1	5	25	0	15%
B4E3E6	cDNA FLJ58832, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	323	34150	5	27	0	22%
A8K651	cDNA FLJ75700, highly similar to Homo sapiens complement component 1, q subcomponent binding protein (C1QBP), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA	282	31342,6	5	23	0	26%
Q9Y696	Chloride intracellular channel protein 4	253	28735,7	5	18	0	22%
Q14019	Coactosin-like protein	142	15917	5	15	5	20%
E9PLT0	Cold shock domain-containing protein E1	668	74518,7	5	20	0	8%
P31146	Coronin-1A	461	50975,8	5	16	2	6%
P27695	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	318	35514,2	5	8	1	14%
P50570	Dynamamin-2	870	97985,2	5	9	0	7%
Q53HU7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (Fragment)	325	36458,6	5	7	0	17%

Q15056	Eukaryotic translation initiation factor 4H	248	27350,4	5	24	1	24%
Q16658	Fascin	493	54478	5	23	0	11%
Q6FI03	G3BP protein	466	52114,1	5	22	0	14%
Q0PHS1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (Fragment)	297	33917	5	17	0	16%
F5H018	GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment)	199	22502,7	5	31	0	31%
A4QPBO	HCG1991735, isoform CRA_a	1657	189115,8	5	19	0	5%
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa), isoform CRA_e	306	32796,1	5	33	0	17%
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	589	64074,4	5	33	2	5%
P16402	Histone H1.3	221	22318,3	5	36	5	18%
P62805	Histone H4	103	11342,4	5	33	0	50%
Q09028	Histone-binding protein RBBP4	425	47608,1	5	19	0	11%
B4DY09	Interleukin enhancer-binding factor 2	352	38868,1	5	21	0	20%
B4DJB4	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	316	34465,3	5	15	0	16%
Q9NQC3	Isoform 2 of Reticulon-4	373	40274,9	5	18	2	12%
Q15424	Isoform 2 of Scaffold attachment factor B1	848	95105,2	5	23	1	4%
Q9UJZ1	Isoform 2 of Stomatin-like protein 2, mitochondrial	311	33298,6	5	19	0	22%
P68036	Isoform 2 of Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	122	14094,3	5	26	0	57%
Q01105	Isoform 3 of Protein SET	265	30956,2	5	28	0	25%
P54136	Isoform Monomeric of Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	588	67079,5	5	10	0	11%
P46013	Isoform Short of Antigen KI-67	2896	319229,8	5	20	1	2%
Q14847	LIM and SH3 domain protein 1	261	29680,2	5	24	1	15%
Q6NX68	MAP4 protein (Fragment)	492	53444,6	5	33	0	15%
P15559	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	274	30830	5	44	1	18%
P00387	NADH-cytochrome b5 reductase 3	301	34194,7	5	27	1	12%
Q96TA1	Niban-like protein 1	746	84066,7	5	10	1	6%
P12270	Nucleoprotein TPR	2363	267113,1	5	10	5	3%
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	152	17268,9	5	36	0	32%
P36551	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochondrial	454	50102	5	24	5	12%
O75475	PC4 and SFRS1-interacting protein	530	60048,7	5	8	5	7%
Q02809	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	727	83479,4	5	8	1	7%
P07737	Profilin-1	140	15026,5	5	44	5	40%

P12004	Proliferating cell nuclear antigen	261	28732,3	5	14	1	20%
P49257	Protein ERGIC-53	510	57495	5	16	2	7%
P13489	Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1, isoform CRA_a	456	49366,8	5	15	0	14%
Q9UKM9	RNA-binding protein Raly	306	32425,6	5	12	1	11%
Q9Y265	RuvB-like 1	456	50178,3	5	23	1	12%
Q9BTA4	Similar to cysteine and glycine-rich protein 1 (Fragment)	168	17792,5	5	20	0	44%
Q04837	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	148	17231	5	31	1	36%
Q15459	Splicing factor 3A subunit 1	793	88812,5	5	12	1	7%
K7ENG2	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	307	33861,9	5	32	0	21%
A2A2D0	Stathmin (Fragment)	86	9840,3	5	25	0	58%
P18031	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1	435	49916,8	5	12	0	12%
Q6PKI6	YBX1 protein (Fragment)	266	29338,7	5	31	0	29%
P62195	26S protease regulatory subunit 8	406	45579	4	8	1	12%
Q02218	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	1023	115843,4	4	12	0	5%
P62249	40S ribosomal protein S16	146	16417	4	24	1	18%
P62266	40S ribosomal protein S23	143	15779,7	4	13	1	23%
D6RB09	40S ribosomal protein S3a (Fragment)	194	22539,9	4	21	0	25%
P05387	60S acidic ribosomal protein P2	115	11639,8	4	20	0	59%
Q6NZ55	60S ribosomal protein L13	211	24232,5	4	18	0	18%
P50914	60S ribosomal protein L14	215	23399	4	18	2	11%
P46778	60S ribosomal protein L21	160	18535,1	4	12	2	14%
P62750	60S ribosomal protein L23a	156	17666,1	4	18	1	21%
P46779	60S ribosomal protein L28	137	15719,7	4	11	1	19%
Q9BWD1	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	397	41306,4	4	20	0	16%
F8VY04	Adenylate kinase 2, mitochondrial	190	21195,1	4	21	0	25%
C9JAK5	ADP-ribosylation factor 4	153	17670	4	24	0	31%
P11766	Alcohol dehydrogenase class-3	374	39680,4	4	8	0	13%
P15121	Aldose reductase	316	35812,5	4	22	0	11%
F8VS02	Alpha-aminoacidic semialdehyde dehydrogenase	475	51360,4	4	10	0	12%
Q59ES3	Amino acid transporter (Fragment)	548	57335,7	4	24	0	11%
Q10567	AP-1 complex subunit beta-1	949	104552,1	4	6	1	4%
O95831	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	613	66840,9	4	10	0	8%
P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1	599	67253	4	7	4	9%

P53396	ATP-citrate synthase	1101	120743,9	4	13	1	4%
K7EIV0	Calpain small subunit 1 (Fragment)	196	22065,7	4	17	0	29%
E7EQ12	Calpastatin	423	46087,7	4	18	0	13%
B3KY56	cDNA FLJ46898 fis, clone UTERU3022168, highly similar to Protein FAM62A	1058	117302,2	4	15	0	5%
B7Z2X4	cDNA FLJ53327, highly similar to Gelsolin	705	77723,1	4	11	0	6%
B7Z8X5	cDNA FLJ61541, highly similar to Homo sapiens PDZ and LIM domain 5 (PDLIM5), transcript variant 2, mRNA	483	52650,8	4	11	0	10%
A8K666	cDNA FLJ75460, highly similar to Homo sapiens phenylalanine-tRNA synthetase-like, beta subunit, mRNA	589	65983,5	4	20	0	7%
B2R6K4	cDNA, FLJ92996, highly similar to Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1 (GNB1), mRNA	340	37259	4	14	0	14%
P09496	Clathrin light chain A	248	27042	4	16	1	16%
O43809	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	227	26192,7	4	15	1	14%
Q59EI4	Copine I variant (Fragment)	517	56706,3	4	12	0	10%
O75367	Core histone macro-H2A.1	372	39574,5	4	7	0	11%
P33316	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	252	26528,6	4	11	1	15%
P25685	DnaJ homolog subfamily B member 1	340	38002,4	4	4	1	13%
Q15717	ELAV-like protein 1	326	36051,1	4	28	0	15%
Q9BS26	Endoplasmic reticulum resident protein 44	406	46923,4	4	11	4	9%
V9HW95	Epididymis secretory protein Li 84	331	38848,2	4	21	0	17%
Q14152	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	1382	166450,3	4	14	1	3%
P23588	Eukaryotic translation initiation factor 4B	611	69092,3	4	6	2	3%
Q86TY5	Galectin	121	13870,2	4	9	0	26%
P09211	Glutathione S-transferase P	210	23323	4	13	1	20%
D6R9P3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	280	30266	4	19	0	15%
Q0D2M2	HIST1H2BC protein	126	13807,5	4	19	0	29%
K7EK07	Histone H3 (Fragment)	132	14887,3	4	17	0	42%
P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	218	24545,6	4	13	1	17%
H0Y8C6	Importin-5 (Fragment)	1099	123763,2	4	19	0	4%
P35998	Isoform 2 of 26S protease regulatory subunit 7	296	33234,2	4	6	0	16%

P62633	Isoform 2 of Cellular nucleic acid-binding protein	170	18711,2	4	15	0	25%
Q86VP6	Isoform 2 of Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	1062	117795,8	4	9	1	4%
P31689	Isoform 2 of DnaJ homolog subfamily A member 1	331	37002,8	4	13	0	20%
P48449	Isoform 2 of Lanosterol synthase	652	74151,6	4	5	0	7%
Q9Y383	Isoform 2 of Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	391	46378,7	4	16	0	12%
P61224	Isoform 2 of Ras-related protein Rap-1b	137	15327,9	4	17	0	37%
O75494	Isoform 5 of Serine/arginine-rich splicing factor 10	165	20086,9	4	9	0	30%
P33176	Kinesin-1 heavy chain	963	109599	4	12	0	5%
P11047	Laminin, gamma 1 (Formerly LAMB2), isoform CRA_a	1573	173881,6	4	23	0	4%
Q8N1G4	Leucine rich repeat containing 47, isoform CRA_a	583	63415,7	4	10	0	12%
B9A041	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	210	23005,8	4	12	0	22%
J3QT28	Mitotic checkpoint protein BUB3 (Fragment)	278	31665,7	4	13	0	17%
P78406	mRNA export factor	368	40923,8	4	6	2	7%
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	727	79398,5	4	5	1	7%
Q9Y266	Nuclear migration protein nudC	331	38201,1	4	21	4	9%
H0YHC3	Nucleosome assembly protein 1-like 1 (Fragment)	198	23384,8	4	12	0	29%
Q9NR12	PDZ and LIM domain protein 7	457	49794,6	4	16	4	10%
J3QS39	Polyubiquitin-B (Fragment)	93	10444,7	4	36	0	46%
Q86UE4	Protein LYRIC	582	63780,8	4	7	1	7%
P55735	Protein SEC13 homolog	322	35500,1	4	11	1	14%
B1AH77	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	148	16746,8	4	10	0	28%
P62820	Ras-related protein Rab-1A	205	22645,4	4	14	1	8%
J3KRE2	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	129	14787,2	4	29	0	25%
D6RER5	Septin-11	432	49759,3	4	15	0	13%
Q07955	Serine/arginine-rich splicing factor 1	248	27709,8	4	15	0	18%
Q9Y3F4	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	350	38396	4	9	1	13%
P49591	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	514	58722	4	14	2	4%
Q9BTQ7	Similar to ribosomal protein L23 (Fragment)	134	14122,7	4	17	0	28%
E9PPJ0	Splicing factor 3B subunit 2	871	97506,7	4	19	0	5%
Q9ULW0	Targeting protein for Xklp2	747	85582	4	10	1	5%
B4DUR8	T-complex protein 1 subunit gamma	500	55620,7	4	13	0	9%
O14773	Tripeptidyl-peptidase 1	563	61191,6	4	17	1	7%

O95292	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	243	27193,1	4	23	1	16%
B2R6D0	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	953	105765,7	3	11	0	5%
P62263	40S ribosomal protein S14	151	16244,5	3	24	3	23%
P62269	40S ribosomal protein S18	152	17689,8	3	7	3	14%
P60866	40S ribosomal protein S20	119	13346,3	3	33	0	25%
P49189	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	494	53749	3	14	1	5%
J3KRX5	60S ribosomal protein L17 (Fragment)	169	19555,2	3	8	0	24%
P84098	60S ribosomal protein L19	196	23433,2	3	18	0	17%
B7Z4E3	60S ribosomal protein L31	120	13928,6	3	14	0	20%
E9PKZ0	60S ribosomal protein L8 (Fragment)	205	22357,2	3	13	0	13%
P30837	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	517	57152,2	3	13	3	8%
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	367	39281,7	3	5	0	5%
R4GMT0	Alpha-centractin	332	37391,9	3	7	0	13%
E7EMC6	Annexin	330	36921,7	3	12	0	12%
P36542	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	298	32957,3	3	8	1	7%
Q9NVI7	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	634	71306,7	3	8	1	3%
P04040	Catalase	527	59700,7	3	3	3	5%
P35222	Catenin (Cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa, isoform CRA_a	781	85424,2	3	16	0	4%
P07339	Cathepsin D	412	44505,6	3	14	1	5%
H0YD13	CD44 antigen	206	22650,6	3	15	0	17%
E9PNW4	CD59 glycoprotein	108	11958,5	3	13	0	31%
Q59EY4	CDC10 protein variant (Fragment)	381	43780,6	3	5	0	13%
Q6FG59	CDC37 protein	378	44407	3	10	0	12%
Q9H9J7	cDNA FLJ12692 fis, clone NT2RM4002623, weakly similar to ASPARTYL-TRNA SYNTHETASE (EC 6.1.1.12)	463	52588	3	10	0	7%
B4DDL4	cDNA FLJ53966, moderately similar to Homo sapiens cytidylate kinase (CMPK), mRNA	181	20527,9	3	11	0	22%
B4DS66	cDNA FLJ54290, highly similar to Mitochondrial inner membrane protein	660	73320	3	11	0	5%
B4DUX0	cDNA FLJ60167, highly similar to Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase(EC 3.1.2.2)	265	29608,1	3	11	0	14%

B4DY23	cDNA FLJ61188, highly similar to Basigin	262	28396,3	3	17	0	10%
Q08ES8	Cell growth-inhibiting protein 34	177	20063,6	3	21	0	18%
B4DJV2	Citrate synthase	453	50381,7	3	18	0	6%
P48444	Coatomer subunit delta	511	57156,1	3	20	0	7%
Q53HG7	Cortactin, isoform CRA_c	513	57413,5	3	9	0	7%
Q14XT3	Cytochrome oxidase subunit II (Fragment)	122	13711	3	22	0	22%
P28838	Cytosol aminopeptidase	519	56112,8	3	11	1	4%
P26358	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	1616	183031,8	3	10	1	1%
P11387	DNA topoisomerase 1	765	90650,9	3	3	1	3%
P39656	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	439	48750,9	3	18	0	7%
P55265	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	1226	135962,9	3	3	1	2%
P13804	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	333	35039,6	3	11	2	4%
V9HW92	Epididymis secretory protein Li 112	329	36031	3	15	0	13%
V9HW41	Epididymis secretory protein Li 71	152	17109	3	18	0	19%
O75822	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J	258	29026,5	3	8	1	9%
P56537	Eukaryotic translation initiation factor 6	245	26564,2	3	14	3	21%
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	843	96616,5	3	5	1	3%
Q9UBI6	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12	72	7983,2	3	16	3	38%
Q13151	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	305	30803,8	3	10	3	12%
D6RE99	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	78	8610,5	3	7	0	46%
Q6PKD2	HNRPCL1 protein (Fragment)	207	22619,8	3	20	0	14%
B4DII5	Importin subunit alpha	533	59585,3	3	11	0	7%
Q6NVW7	Importin subunit alpha	529	57911	3	24	0	8%
Q8IYQ9	Importin subunit alpha	521	57846,8	3	11	0	6%
P62191	Isoform 2 of 26S protease regulatory subunit 4	367	41123,2	3	3	0	11%
P07741	Isoform 2 of Adenine phosphoribosyltransferase	134	14529,8	3	18	0	23%
P47756	Isoform 2 of F-actin-capping protein subunit beta	272	30591,4	3	19	1	7%
P49915	Isoform 2 of GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	594	65869,5	3	6	0	8%
Q9NR30	Isoform 2 of Nucleolar RNA helicase 2	715	79589,4	3	14	0	5%
P50395	Isoform 2 of Rab GDP dissociation inhibitor beta	400	45572,2	3	8	0	8%
P62316	Isoform 2 of Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	108	12372,6	3	21	0	35%

P10599	Isoform 2 of Thioredoxin	85	9427,7	3	16	0	38%
P30048	Isoform 2 of Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	238	25804,3	3	25	0	16%
Q92973	Isoform 2 of Transportin-1	890	101226,3	3	4	0	4%
Q9UIG0	Isoform 2 of Tyrosine-protein kinase BAZ1B	1479	170322,4	3	4	0	3%
P31942	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	297	31487,4	3	19	0	15%
P13674	Isoform 3 of Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	516	58903	3	17	0	8%
Q9UNZ2	Isoform 4 of NSFL1 cofactor p47	259	28486,7	3	15	0	14%
Q13492	Isoform 4 of Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein	551	59862,7	3	5	0	9%
Q15637	Isoform 4 of Splicing factor 1	548	59655,9	3	14	0	6%
O94979	Isoform 5 of Protein transport protein Sec31A	509	56677,5	3	9	0	6%
Q9NSE4	Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial	1012	113701,1	3	7	1	3%
Q04760	Lactoylglutathione lyase	184	20746,2	3	13	1	8%
Q96AG4	Leucine-rich repeat-containing protein 59	307	34890,9	3	12	3	14%
F8VQE1	LIM domain and actin-binding protein 1	598	66932	3	14	0	5%
P36776	Lon protease homolog, mitochondrial	959	106404,4	3	3	1	2%
Q15046	Lysine--tRNA ligase	597	67986,6	3	15	0	6%
O00264	Membrane-associated progesterone receptor component 1	195	21639,7	3	18	1	12%
P61081	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	183	20868,6	3	12	2	9%
P26885	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	142	15621,3	3	15	0	25%
A2VCQ4	PRKCSH protein (Fragment)	181	20234,9	3	14	0	17%
Q969G5	Protein kinase C delta-binding protein	261	27666,5	3	9	0	14%
B3KMB7	Pyrroline-5-carboxylate reductase family, member 2, isoform CRA_a	212	22255,5	3	20	0	13%
P08559	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	390	43249,6	3	5	2	3%
Q08257	Quinone oxidoreductase	329	35166,5	3	9	1	6%
P61019	Ras-related protein Rab-2A	212	23512,8	3	6	1	14%
P35637	RNA-binding protein FUS	526	53375,8	3	18	1	4%
Q13242	Serine/arginine-rich splicing factor 9	221	25508,4	3	14	1	10%
Q08209	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	521	58632,3	3	4	1	4%

Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	1233	143126,1	3	5	0	2%
P55809	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	520	56103,9	3	7	0	5%
Q13148	TAR DNA-binding protein 43	414	44693,3	3	9	1	7%
F5H282	T-complex protein 1 subunit alpha	332	36415,2	3	3	0	11%
C9J3L8	Translocon-associated protein subunit alpha	265	29536,8	3	19	0	13%
Q9Y3I0	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	505	55156,8	3	14	3	7%
P08621	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	437	51507,8	3	9	1	5%
P45974	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	858	95707,3	3	14	0	5%
Q96QK1	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	796	91630,9	3	8	1	3%
P21281	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	511	56446,9	3	11	3	9%
HOYJCO	26S protease regulatory subunit 10B (Fragment)	262	29617,5	2	7	0	11%
E9PKD5	26S protease regulatory subunit 6A (Fragment)	311	34574,3	2	13	0	8%
P55036	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	377	40693,2	2	4	0	11%
B2RB23	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	394	41557,4	2	4	0	5%
I3L3P7	40S ribosomal protein S15a	100	11452,2	2	7	0	22%
P62851	40S ribosomal protein S25	125	13715,7	2	8	2	14%
K7EJT5	60S ribosomal protein L22 (Fragment)	47	5061,7	2	15	0	51%
C9JXB8	60S ribosomal protein L24	121	14341,8	2	9	0	14%
E9PJD9	60S ribosomal protein L27a	91	10102,6	2	11	0	23%
P83881	60S ribosomal protein L36a	106	12414,8	2	11	0	16%
P63173	60S ribosomal protein L38	70	8194,7	2	2	0	24%
V9HWB7	Aconitate hydratase	889	98318,6	2	5	0	2%
P61160	Actin-related protein 2	394	44714,2	2	5	0	7%
B4DM63	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	167	19030,9	2	3	0	8%
O15511	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	151	16292,3	2	4	0	15%
P53999	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	127	14368,4	2	6	0	19%
Q8TAF6	Acyl-CoA synthetase 4	670	74355,9	2	5	0	4%
B2R856	Acyl-coenzyme A oxidase	700	77489,8	2	2	0	4%
D3DPU2	Adenylyl cyclase-associated protein	475	51622,6	2	10	1	3%
Q12797	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	758	85791,4	2	6	0	5%
P30049	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	168	17461,2	2	9	2	14%
Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	784	85523,5	2	8	0	3%

B5BUB5	Autoantigen La (Fragment)	408	46820,2	2	5	0	6%
A6XMH5	Beta-2-microglobulin	92	10374,4	2	18	0	35%
V9GYZ6	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase (Fragment)	968	108954	2	3	0	2%
P11586	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	935	101477,3	2	3	1	1%
X6R5C5	Carboxypeptidase	481	54203	2	5	0	6%
O60716	Catenin delta-1	968	108085,4	2	2	0	3%
B3KP14	cDNA FLJ30937 fis, clone FEBRA2007247, highly similar to G-rich sequence factor 1	412	46648	2	12	0	6%
B4DUQ9	cDNA FLJ50873, highly similar to DNA replication licensing factor MCM3	762	85567,3	2	7	0	3%
B4DFP1	cDNA FLJ51818, highly similar to Phosphoglucomutase-1 (EC 5.4.2.2)	538	58684	2	3	0	4%
B4DDV4	cDNA FLJ52530, highly similar to Tumor protein D54	157	17147,8	2	7	0	15%
B4DJE7	cDNA FLJ52595, highly similar to Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.3.99.3)	232	25629,2	2	8	0	14%
B7Z1V9	cDNA FLJ53310, highly similar to Puromycin-sensitive aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	473	53100,5	2	17	0	5%
B4E233	cDNA FLJ53594, highly similar to Muscleblind-like protein	301	31624,9	2	2	0	11%
B7Z1X9	cDNA FLJ53726, highly similar to Coiled-coil-helix-coiled-coil-helixdomain-containing protein 3	138	15584,2	2	11	0	14%
B4DY35	cDNA FLJ55007, highly similar to Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial	186	19902,7	2	4	0	12%
B4E0S6	cDNA FLJ55635, highly similar to pre-mRNA-splicing factorATP-dependent RNA helicase DHX15 (EC 3.6.1.-)	784	89472,5	2	6	0	2%
B4DS32	cDNA FLJ56236, highly similar to Exportin-2	569	64323,4	2	12	0	3%
B4DKJ4	cDNA FLJ57738, highly similar to Translationally-controlled tumor protein	142	16075,7	2	4	0	14%
B4DW90	cDNA FLJ58737, highly similar to Splicing factor 3A subunit 3	448	52377,1	2	10	0	5%
B4DI19	cDNA FLJ59524, highly similar to CysteinyI-tRNA synthetase (EC 6.1.1.16)	662	75620,4	2	13	0	4%
B4E1E2	cDNA FLJ61530, highly similar to Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	661	74789,6	2	2	0	6%

A8K9K4	cDNA FLJ75504, highly similar to Homo sapiens glucosidase I, mRNA	562	62182,3	2	16	0	5%
B2R7G6	cDNA, FLJ93437, highly similar to Homo sapiens histidyl-tRNA synthetase-like (HARSL), mRNA	506	56834,6	2	5	0	4%
B2R858	cDNA, FLJ93750, Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6 (DDX6), mRNA	472	53164,7	2	5	0	4%
B2R9I9	cDNA, FLJ94417, highly similar to Homo sapiens WD repeat domain 57 (U5 snRNP specific) (WDR57), mRNA	357	39223,7	2	3	0	13%
P60953	Cell division control protein 42 homolog	191	21227	2	15	0	16%
Q9UNM1	Chaperonin 10-related protein (Fragment)	97	10270,6	2	13	0	22%
C9JMM0	Chromobox protein homolog 3 (Fragment)	62	7198,7	2	12	0	32%
Q8IYN5	CKAP5 protein	953	106879,9	2	3	0	3%
P35606	Coatomer subunit beta'	906	102404,5	2	3	0	2%
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	1364	129054,4	2	4	0	2%
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	1019	108493,9	2	7	0	2%
O75131	Copine III, isoform CRA_a	537	60074,1	2	7	0	3%
Q9BR76	Coronin	489	54182,2	2	4	0	4%
Q6FHJ9	COX5B protein (Fragment)	129	13669,9	2	7	0	22%
Q6PKC2	CROP protein (Fragment)	236	26980,8	2	6	0	11%
Q8IY44	CTBP2 protein	513	56147,5	2	2	0	4%
P47985	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	274	29631,4	2	5	2	8%
P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	169	19546	2	7	2	12%
O00483	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4	81	9345,9	2	7	0	27%
K7EQ02	DAZ-associated protein 1 (Fragment)	327	34980,1	2	7	0	9%
Q13011	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	328	35775,4	2	6	2	8%
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	795	87229,5	2	3	0	3%
Q9Y295	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	367	40498,8	2	6	2	7%
E5RG31	DNA replication licensing factor MCM4 (Fragment)	279	31652,6	2	4	0	6%
B4DNN2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4, isoform CRA_b	222	24921,8	2	3	0	13%
O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2	412	45698,6	2	2	1	3%
Q9UBS4	DnaJ homolog subfamily B member 11	358	40470,6	2	6	2	8%
Q6DEN2	DPYSL3 protein	684	73845,9	2	2	0	3%

Q14258	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	630	70909,7	2	12	0	5%
Q6IBU0	EIF5 protein	431	49102,7	2	12	0	4%
P30040	Endoplasmic reticulum resident protein 29	261	28957,1	2	11	0	8%
V9HWK2	Epididymis luminal protein 114	1134	123703,8	2	11	0	3%
Q96HE7	ERO1-like protein alpha	468	54340	2	5	2	6%
B4E1K8	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	451	52776,2	2	5	0	5%
B4DMT5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	307	33201	2	4	0	10%
O60841	Eukaryotic translation initiation factor 5B	1220	138578,7	2	2	0	3%
Q96CS3	FAS-associated factor 2	445	52572,5	2	5	2	5%
J3QRD1	Fatty aldehyde dehydrogenase	393	44601,7	2	6	0	6%
Q96BS4	FBL protein (Fragment)	260	28413,8	2	8	0	8%
P30043	Flavin reductase (NADPH)	206	22087,4	2	10	0	12%
Q06787	Fragile X mental retardation protein 1	632	71112,9	2	9	1	2%
Q96IJ6	GDP-mannose pyrophosphorylase A, isoform CRA_a	420	46244,1	2	12	0	6%
G3V1U5	Golgi transport 1 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>), isoform CRA_c	74	8190,5	2	2	0	20%
Q9BVP2	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	549	61936,4	2	3	0	5%
Q9UKX7	HCG1989366, isoform CRA_a	468	50095,2	2	2	0	7%
Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	704	80041,7	2	5	0	3%
B0QZK4	Heterochromatin protein 1-binding protein 3 (Fragment)	253	28479,4	2	10	0	10%
P19367	Hexokinase-1	917	102402,1	2	9	1	2%
Q9NZL4	Hsp70-binding protein 1	362	39430,5	2	10	0	6%
Q96KP4	Isoform 2 of Cytosolic non-specific dipeptidase	391	43787,3	2	3	0	6%
P98082	Isoform 2 of Disabled homolog 2	552	58806,5	2	6	0	4%
Q92900	Isoform 2 of Regulator of nonsense transcripts 1	1118	122940	2	4	0	2%
P16615	Isoform 2 of Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	997	109602,2	2	11	0	3%
P61956	Isoform 2 of Small ubiquitin-related modifier 2	71	8088	2	21	0	31%
Q9HB71	Isoform 3 of Calcyclin-binding protein	185	21196,9	2	16	0	9%
O94925	Isoform 3 of Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	598	65399,9	2	3	1	3%
Q96AB3	Isoform 3 of Isochorismatase domain-containing protein 2, mitochondrial	135	14737,8	2	2	0	30%
P68402	Isoform 3 of Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	132	14860,4	2	9	0	19%

Q32P28	Isoform 3 of Prolyl 3-hydroxylase 1	804	90540,8	2	9	0	3%
O60493	Isoform 4 of Sorting nexin-3	140	16287,4	2	8	0	11%
Q9H2U2	Isoform 5 of Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	232	25957,2	2	10	0	12%
P07954	Isoform Cytoplasmic of Fumarate hydratase, mitochondrial	467	50162,7	2	5	0	7%
O15460	Isoform IIa of Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2	533	60576,5	2	2	0	4%
Q14203	Isoform p135 of Dynactin subunit 1	1144	127306,6	2	2	1	1%
P30419	Isoform Short of Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	416	48091,8	2	6	0	5%
F6S6P2	Large proline-rich protein BAG6 (Fragment)	515	54618,2	2	14	0	4%
H3BQK6	Major vault protein (Fragment)	220	25076,1	2	2	0	10%
A5D6X1	MAP1B protein (Fragment)	726	81891,3	2	8	0	3%
HOYHV5	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic (Fragment)	233	26665,4	2	4	0	10%
A4UYK5	MHC class I antigen (Fragment)	181	20785	2	13	1	15%
M0R003	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50 (Fragment)	257	28187,6	2	8	0	9%
Q8N4H5	Mitochondrial import receptor subunit TOM5 homolog	51	6013,4	2	2	0	33%
P60660	Myosin light polypeptide 6	151	16901,1	2	4	1	9%
F8W1N5	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha (Fragment)	71	7790,3	2	10	0	41%
Q15843	NEDD8	81	9047,9	2	5	2	31%
P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	491	55468,6	2	10	1	4%
E9PIN3	Nuclear RNA export factor 1 (Fragment)	603	68046,7	2	6	0	5%
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	187	21025,7	2	6	1	7%
Q8IV08	Phospholipase D family, member 3, isoform CRA_b	490	54652,5	2	2	0	4%
Q15102	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma	231	25700,2	2	10	1	4%
O43143	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	795	90857,2	2	6	0	2%
Q96IZ0	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	340	36527,4	2	2	1	4%
D6RDA2	Protein DEK (Fragment)	122	14129,6	2	16	0	16%
Q9UNF0	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	486	55685,9	2	7	1	2%
F8VZN8	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A (Fragment)	692	76469	2	7	0	3%
P26447	Protein S100-A4	101	11702,7	2	4	1	9%
Q9UF24	Putative uncharacterized protein DKFzP586K0821 (Fragment)	190	22186,3	2	3	0	13%

Q53T70	Putative uncharacterized protein RAB10 (Fragment)	157	17781,1	2	12	0	15%
Q53T09	Putative uncharacterized protein XRCC5 (Fragment)	568	64184,9	2	11	0	4%
O00764	Pyridoxal kinase	312	35061,9	2	3	1	7%
P61006	RAB8A, member RAS oncogene family, isoform CRA_a	207	23635,2	2	12	0	13%
P46060	Ran GTPase-activating protein 1	587	63484,3	2	3	1	2%
F6WQW2	Ran-specific GTPase-activating protein	278	31866,3	2	9	0	8%
Q9UN86	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	482	54069,8	2	2	1	4%
X6RFL8	Ras-related protein Rab-14 (Fragment)	181	20378,3	2	13	0	16%
C9J0T6	Ras-related protein Rab-17 (Fragment)	130	14520,5	2	5	0	10%
P35250	Replication factor C subunit 2	354	39114,1	2	2	1	4%
Q96D15	Reticulocalbin-3	328	37452	2	14	2	8%
Q07960	Rho GTPase-activating protein 1	439	50386,2	2	2	1	3%
Q5JR07	Rho-related GTP-binding protein RhoC (Fragment)	127	14357,2	2	8	0	24%
I3L3C4	Ribosomal L1 domain-containing protein 1 (Fragment)	158	18505,2	2	11	0	13%
P49756	RNA-binding protein 25	843	100106,4	2	5	2	4%
B2R6F3	Serine/arginine-rich-splicing factor 3	95	10296	2	22	0	24%
Q5JV99	Serine/threonine-protein kinase 24 (Fragment)	142	15740,8	2	4	0	20%
H0YBN9	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform (Fragment)	52	6077	2	8	0	37%
U3KQT1	S-formylglutathione hydrolase (Fragment)	120	13085,8	2	11	0	22%
Q05BU6	SFRS11 protein (Fragment)	246	24814,1	2	8	0	10%
Q5T123	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	88	9356,7	2	15	0	28%
D6RFI0	Sideroflexin-1 (Fragment)	194	21472,9	2	5	0	11%
P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	136	14542,8	2	10	1	10%
H7C4H2	Signal recognition particle receptor subunit beta (Fragment)	160	17586,4	2	15	0	18%
Q53G21	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A' variant (Fragment)	255	28438,1	2	7	0	12%
J3QLI9	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	75	8369,7	2	21	0	44%
P54709	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	279	31474,1	2	5	1	5%
Q9GZT3	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	109	12323,4	2	5	1	13%
Q9H3N1	Thioredoxin-related transmembrane protein 1	280	31752,8	2	4	2	8%
X6RJP6	Transgelin-2 (Fragment)	187	21054,5	2	9	0	16%

F8WF48	Translocation protein SEC62	85	9846	2	5	0	21%
A6NLM8	Translocon-associated protein subunit delta	148	16217,2	2	12	0	20%
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	528	59088,1	2	4	2	4%
Q13404	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	147	16466,3	2	8	0	13%
F2Z2F3	Uncharacterized protein	143	15616,8	2	6	0	24%
F8W031	Uncharacterized protein (Fragment)	263	29187,9	2	11	1	9%
P26640	Valine--tRNA ligase	1264	140369,4	2	4	0	2%
P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	380	39787,1	2	10	0	4%
Q8NI36	WD repeat-containing protein 36	895	99285,1	2	7	0	3%
C9JJK5	Zyxin (Fragment)	171	19040	2	9	0	13%
Q16698	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	335	36026,8	1	3	0	3%
Q9UEH5	24-kDa subunit of complex I (Fragment)	231	25396	1	5	0	6%
H7C2P7	39S ribosomal protein L23, mitochondrial (Fragment)	118	13755,5	1	2	0	8%
H7C131	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal (Fragment)	290	30298,9	1	15	0	4%
B0ZBD0	40S ribosomal protein S19	71	7808,2	1	9	0	13%
P63220	40S ribosomal protein S21	83	9087,6	1	8	0	11%
E7ETK0	40S ribosomal protein S24	132	15325,4	1	9	0	9%
P62857	40S ribosomal protein S28	69	7818,2	1	9	0	17%
Q5T1M7	60 kDa U4/U6 snRNP-specific spliceosomal protein	521	58266,3	1	3	0	2%
P05386	60S acidic ribosomal protein P1	114	11488,7	1	8	0	14%
E5RI99	60S ribosomal protein L30	51	5533,7	1	8	0	31%
F2Z388	60S ribosomal protein L35	96	10620	1	9	0	10%
B4DRX3	60S ribosomal protein L6	227	26038,9	1	3	0	5%
P30520	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	456	50047,8	1	2	0	3%
C9JVY5	A-kinase anchor protein 2 (Fragment)	778	85212,9	1	3	0	3%
Q16706	Alpha-mannosidase 2	1144	131039,3	1	2	0	1%
J3KPY9	Anthrax toxin receptor 2	411	44794,6	1	9	0	2%
P08243	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	561	64310,6	1	4	0	2%
Q9UBB4	Ataxin-10	475	53436,8	1	2	0	4%
C9JQQ5	Atlastin-2 (Fragment)	175	20269,3	1	4	0	9%
O95816	BAG family molecular chaperone regulator 2	211	23739,2	1	2	0	5%
Q2I0Y7	Casein kinase 2 alpha isoform	385	45233,9	1	3	0	3%
E7EMS6	Catechol O-methyltransferase (Fragment)	223	24804,2	1	6	0	7%

B3KM81	cDNA FLJ10471 fis, clone NT2RP2000045, highly similar to Dnal homolog subfamily A member 3, mitochondrial	453	49534,1	1	2	0	4%
Q9NUP3	cDNA FLJ11224 fis, clone PLACE1008273, moderately similar to COATOMER GAMMA SUBUNIT	483	53971,7	1	8	0	2%
B3KY60	cDNA FLJ16777 fis, clone BRHIP2029567, highly similar to Cell division cycle 5-like protein	802	92201,7	1	6	0	1%
B3KUH4	cDNA FLJ39909 fis, clone SPLEN2017918, highly similar to EH-domain-containing protein 2	342	38639,2	1	4	0	3%
B3KXF9	cDNA FLJ45348 fis, clone BRHIP3011269, weakly similar to Prenylcysteine oxidase (EC 1.8.3.5)	376	42424,4	1	5	0	3%
B4DIX0	cDNA FLJ50778, highly similar to Protein flightless-1 homolog	1238	141373,9	1	2	0	1%
B4DNL3	cDNA FLJ53145, highly similar to Ankyrbin (Fragment)	659	74479	1	3	0	2%
B4DU91	cDNA FLJ55368, highly similar to Epsin-1	536	55779,5	1	2	0	4%
B4DF22	cDNA FLJ55615, highly similar to SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily C member 2	1019	112125	1	4	0	2%
B7Z438	cDNA FLJ56352, highly similar to Succinyl-CoA ligase (GDP-forming) subunit alpha, mitochondrial (EC 6.2.1.4)	248	26440,7	1	5	0	6%
B7Z601	cDNA FLJ57187, highly similar to Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.1.99.5)	500	55686,4	1	5	0	3%
B4DHS3	cDNA FLJ57984, highly similar to Nucleolysin TIAR	181	20349,2	1	3	0	6%
B4DL61	cDNA FLJ60291	355	39870,3	1	5	0	4%
B4DJQ7	cDNA FLJ60602, moderately similar to D-dopachrome decarboxylase (EC 4.1.1.84)	112	11649,8	1	4	0	10%
B4DTW7	cDNA FLJ61400, highly similar to Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1	221	24098,5	1	4	0	7%
A8K3Y5	cDNA FLJ78186	379	43577,9	1	2	0	4%
E5RHJ4	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2 (Fragment)	277	31052,6	1	3	0	5%
H3BRM8	Cirhin (Fragment)	211	23192	1	3	0	10%
R4GNF2	COMM domain-containing protein 3 (Fragment)	74	8580,3	1	2	0	16%
P46109	Crk-like protein	303	33737,9	1	3	1	4%
Q9UBG0	C-type mannose receptor 2	1479	166550	1	9	1	1%
E9PIZ4	Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	116	13116,4	1	2	0	13%

P14854	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	86	10167,7	1	3	1	13%
P09669	Cytochrome c oxidase subunit 6C	75	8757,7	1	4	0	11%
B3KVV6	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1 (Fragment)	185	21130,1	1	5	0	6%
Q96HY6	DDR GK domain-containing protein 1	298	33900,6	1	3	0	5%
F5H895	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1	65	7265,8	1	2	0	18%
Q53F47	Down-regulator of transcription 1 variant (Fragment)	176	19441,7	1	8	0	7%
E5KLJ5	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	1015	117652,1	1	3	0	2%
Q9NP97	Dynein light chain roadblock-type 1	96	10896,7	1	7	0	12%
Q14669	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	1992	220277,8	1	12	0	1%
V9HW35	Epididymis secretory protein Li 55	162	17002	1	4	0	5%
E5RHS5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E (Fragment)	226	26600,7	1	5	0	4%
E5RJTO	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H (Fragment)	244	28339,4	1	5	0	6%
H7C044	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (Fragment)	226	24773,8	1	5	1	8%
Q8NF45	FLJ00353 protein (Fragment)	1766	200197,6	1	10	0	1%
O60763	General vesicular transport factor p115	962	107810	1	9	0	1%
P10253	Glucosidase, alpha acid (Pompe disease, glycogen storage disease type II), isoform CRA_a	952	105252,8	1	2	0	2%
B2R6A7	Glucosylceramidase	487	54365,3	1	6	0	3%
M0QX71	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1 (Fragment)	228	25443,3	1	5	0	7%
Q5TA02	Glutathione S-transferase omega-1 (Fragment)	200	23308	1	5	0	5%
P41250	Glycine--tRNA ligase	739	83094,6	1	4	0	2%
Q5PXD5	Golgi matrix protein GM130 (Fragment)	194	21997	1	3	0	5%
B4DWV5	GrpE protein homolog	196	21868,6	1	3	0	6%
M0QXN5	HCG19665, isoform CRA_a	522	53204,5	1	2	0	2%
Q7Z4Q2	HEAT repeat-containing protein 3	680	74517	1	3	1	2%
C9JPK5	Integrin beta (Fragment)	98	11236,8	1	3	0	17%
P43686	Isoform 2 of 26S protease regulatory subunit 6B	387	43462,5	1	7	0	5%
Q9NYK5	Isoform 2 of 39S ribosomal protein L39, mitochondrial	353	40413,7	1	2	0	4%
Q99640	Isoform 2 of Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase	480	52094,6	1	3	0	3%
Q6NYC8	Isoform 2 of Phostensin	377	42788,7	1	5	0	5%

Q9Y570	Isoform 2 of Protein phosphatase methylesterase 1	199	22429,2	1	2	0	6%
P31153	Isoform 2 of S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	299	32926,1	1	7	0	5%
P62318	Isoform 2 of Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	120	13264,9	1	9	0	8%
Q8WU90	Isoform 2 of Zinc finger CCCH domain-containing protein 15	162	18917,7	1	8	0	7%
Q8WYA6	Isoform 3 of Beta-catenin-like protein 1	311	36061,5	1	6	0	3%
P00390	Isoform 3 of Glutathione reductase, mitochondrial	469	50446,8	1	4	0	3%
Q27J81	Isoform 3 of Inverted formin-2	234	25919,5	1	2	0	6%
Q6PIU2	Isoform 3 of Neutral cholesterol ester hydrolase 1	275	31130,1	1	11	0	6%
O00560	Isoform 3 of Syntenin-1	292	31723,5	1	4	0	6%
A0FGR8	Isoform 4 of Extended synaptotagmin-2	527	59348,2	1	7	0	3%
Q7Z4H8	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 2, isoform CRA_a	507	58517,2	1	4	0	3%
Q8TAS6	LAMB1 protein (Fragment)	1083	118817,8	1	4	0	2%
F8W114	La-related protein 4 (Fragment)	125	14115,8	1	12	0	10%
E9PMP7	LIM domain only protein 7 (Fragment)	1046	119435,2	1	4	0	2%
F2Z2Q9	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	70	7477,8	1	7	0	13%
I4AY87	Macrophage migration inhibitory factor (Fragment)	115	12450,2	1	9	0	8%
Q9BWF4	MCM2 protein (Fragment)	362	41220	1	5	0	2%
Q7Z5D5	Medulloblastoma antigen MU-MB-2.50 (Fragment)	384	43691,3	1	6	0	3%
Q96B43	Methionine aminopeptidase (Fragment)	253	28194	1	2	0	4%
H0Y903	Methionine aminopeptidase 1 (Fragment)	116	13120,3	1	2	0	17%
B3KMA8	Methyl-CpG-binding domain protein 3 (Fragment)	130	14432,5	1	5	0	12%
G3V4Z4	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	252	26989,8	1	4	0	7%
E9PLD2	Mitochondrial fission regulator 1-like	195	21159,6	1	2	0	7%
Q9NV56	MRG/MORF4L-binding protein	204	22385	1	3	1	6%
Q5QTQ6	MSTP010	216	24618,7	1	7	0	5%
Q96RX5	NADH ubiquinone oxidoreductase PDSW subunit (RH 16p13.3) (Fragment)	43	5062,6	1	6	0	33%
E7ENN3	Nesprin-1	477	54666,6	1	7	0	3%
I3L2R3	Nuclear distribution protein nudE homolog 1 (Fragment)	137	14163,6	1	2	0	9%
I3L4U9	Nuclear protein localization protein 4 homolog	134	14864,8	1	3	0	13%
H0YJH9	Polyadenylate-binding protein 2 (Fragment)	96	11059,8	1	6	0	11%
C9J0J7	Profilin-2	91	9816,1	1	3	0	15%

B7Z478	Proteasome subunit beta type-2	84	9533,1	1	9	0	13%
E5RJY1	Protein NDRG1	103	10954,1	1	9	0	14%
Q96ER3	Protein SAAL1	474	53505,7	1	6	0	2%
Q5JQ44	Putative uncharacterized protein DKFZp547A0616 (Fragment)	181	20263,1	1	8	0	7%
Q8NDD7	Putative uncharacterized protein DKFZp564M063 (Fragment)	561	63462,2	1	3	0	2%
Q4W5H3	Putative uncharacterized protein PAPSS1 (Fragment)	257	29462,8	1	3	0	5%
Q53EY4	RAB31, member RAS oncogene family variant (Fragment)	195	21653,9	1	5	0	7%
H0YFI1	Ragulator complex protein LAMTOR1 (Fragment)	79	8687,3	1	5	0	16%
J3QLC6	Ras-related protein Rab-34, isoform NARR (Fragment)	156	17456	1	5	1	8%
C9JXC1	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 (Fragment)	289	33749,1	1	3	0	4%
Q32XH3	Ribosomal protein L18a-like protein	136	15763,1	1	7	0	10%
B4DN06	Ribosomal protein L3, isoform CRA_i	122	13889,4	1	3	0	7%
H0YDG7	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform (Fragment)	224	24723,2	1	4	0	8%
H0YNX5	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11 (Fragment)	106	11960,4	1	5	0	8%
E9PRB9	Signal peptidase complex subunit 2	87	10138,3	1	9	0	10%
K7EL89	Spermidine synthase (Fragment)	83	9300,7	1	3	0	12%
E5RJR5	S-phase kinase-associated protein 1	163	18690,3	1	6	0	7%
C9JDR0	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating (Fragment)	254	28110,4	1	2	0	5%
E7EW15	TNFAIP3-interacting protein 1 (Fragment)	257	27791,2	1	2	0	5%
H0Y4R4	Torsin-1A-interacting protein 1 (Fragment)	296	33714	1	7	0	4%
Q12788	Transducin beta-like protein 3	808	88960,5	1	2	1	2%
E9PFF2	Transketolase	334	36408,3	1	4	0	6%
Q2VEU0	Truncated mercaptopyruvate sulfurtransferase variant	84	9456,7	1	3	0	15%
Q5VU77	Ubiquitin-associated protein 2-like (Fragment)	350	37920,2	1	8	0	3%
D6RDM7	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K (Fragment)	123	14008,2	1	2	0	10%
D6RIU4	Vesicular integral-membrane protein VIP36 (Fragment)	192	21915,6	1	4	0	5%
J3QRS2	Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2 (Fragment)	122	13859,2	1	4	0	7%

Anexo 3 : Proteínas Identificadas po MS/MS ligadas direta ou indiretamente a "beads" de látex sem revestimento

Cod. Uniprot	Identificação	Comprimento Proteína (#AA)	Peso Molecular (Da)	Número de Peptídeos	Número de Espectros	Cobertura
C7DJS2	Glutathione S-transferase pi (Fragment)	151	16639	1	1	9%
P80723	Brain acid soluble protein 1	227	22662	6	20	42%
Q6LA76	AF-4 protein	1211	131564	1	4	1%
V9HW22	Epididymis luminal protein 33	646	70836	3	4	7%
E9PKE3	Heat shock cognate 71 kDa protein	627	68745	3	4	7%
P35637	RNA-binding protein FUS	526	53376	3	5	6%
E9PNW4	CD59 glycoprotein	108	11959	1	1	13%
P08670	Vimentin	466	53601	8	12	15%
Q9P2E9	Ribosome-binding protein 1	1410	152363	2	4	2%
P14618	Pyruvate kinase PKM	531	57882	5	8	11%
P15144	Aminopeptidase N	967	109453	1	6	1%
P02545	Prelamin-A/C	664	74077	5	9	8%
P06733	Alpha-enolase	434	47121	8	12	19%
P60174-1	Isoform 2 of Triosephosphate isomerase	249	26635	1	3	5%
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	372	38705	1	5	5%
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	451	50086	3	12	6%
P62805	Histone H4	103	11342	2	4	19%
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	332	36647	3	7	7%
Q8NBS9	Thioredoxin domain-containing protein 5	432	47581	1	2	2%
P14625	Endoplasmin	803	92393	2	5	3%
P30101	Protein disulfide-isomerase A3	505	56729	1	7	2%
P16402	Histone H1.3	221	22318	3	5	14%
Q15149-2	Isoform 2 of Plectin	4574	518139	2	3	0%
J3QS39	Polyubiquitin-B (Fragment)	93	10445	1	2	17%
B2RDX5	Threonyl-tRNA synthetase (TARS)	711	82043	1	1	2%
P68104	Elongation factor 1-alpha 1	462	50091	3	5	7%
J3QRS3	Myosin regulatory light chain 12A	177	20426	3	3	18%
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	573	60998	5	6	5%
Q6NZ55	60S ribosomal protein L13	211	24233	1	2	5%

P09493-10	Isoform 10 of Tropomyosin alpha-1 chain	284	32828	3	4	9%
U3KQK0	Histone H2B	166	18774	3	5	13%
P09211	Glutathione S-transferase P	210	23323	1	1	5%
K7EK07	Histone H3 (Fragment)	132	14887	2	4	11%
P13639	Elongation factor 2	858	95259	2	3	2%
Q96QV6	Histone H2A type 1-A	131	14207	1	1	7%
P60709	Actin, cytoplasmic 1	375	41692	4	19	13%
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	623	62009	1	8	4%
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	639	65375	2	6	7%
Q07065	Cytoskeleton-associated protein 4	602	65965	3	11	8%
P29966	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	330	31559	4	14	19%

Anexo Tabela 4: Processos biológicos associadas às proteínas identificadas de acordo à base de dados KEGG.*

IDENTIFICAÇÃO DO PROCESSO BIOLÓGICO	n
VIAS METABÓLICAS	156
RIBOSOMAS	54
PROCESSAMENTO DE PROTEÍNAS NO R.E.	46
SPLICEOSSOMA	45
TRANSPORTE DE RNA	44
ADESÃO FOCAL	34
METABOLISMO DO CARBONO	33
DOENÇA DE PARKINSON	31
DOENÇA DE HUNGTINGTON	29
REGULAÇÃO DO CITOESQUELETO DE ACTINA	29
FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA	28
DOENÇA DE ALZHEIMER	27
VI DE SINALIZAÇÃO PI3K-AKT	26
PROTEOGLICANOS EM CANCER	25
FAGOSSOMA	24
VIAS ASSOCIADAS A CANCER	23
LISSOSSOMA	21
INFECÇÃO PELO VIRUS EPSTEIN-BARR	20
ENDOCITOSE	19
CICLO CELULAR	19
BIOSÍNTESE DE AMINOACIL-tRNA	19
DEGRADAÇÃO DE VALINA, LEUCINA E ISOLEUCINA	19
INVASÃO BACTERINA DE CÉLULAS EPITELIAIS	19
INTERAÇÃO ECM-RECEPTOR	18
CARCINOGENESE VIRAL	18
DEGRADAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS	18
BIOSÍNTESE DE AMINO ÁCIDOS	18
VIA DE VIGILÂNCIA DE mRNA	17
JUNÇÃO CELULAR	17
ESTEATÓSE HEPÁTICA NÃO ALCÓLICA	17

*Foram representadas os processos biológicos com o maior número (n) de proteínas envolvidas.

Anexo Tabela 5: Vias metabólicas associadas às proteínas identificadas de acordo à base de dados KEGG, GO e Pathway Interaction Database.

ACTIVAÇÃO DE EXPRESSÃO DE GENES VIA SREBF (SREBP)
ALONGAMENTO E DEGRADAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS
BETA OXIDAÇÃO DE LAURIL-COA A DECANOIL-COA-COA
BETA-OXIDAÇÃO MITOCONDRIAL DE ÁCIDOS GRAXOS NÃO SATURADOS
BIOSÍNTESE DE HORMÔNIOS ESTERÓIDES
BIOSÍNTESE DE AMINO ÁCIDOS
BIOSÍNTESE DE GLICOESFINGOLIPÍDEOS - (SÉRIE GANGLIO)
BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS NÃO SATURADOS
BIOSÍNTESE TERPENÓIDES
CICLO TCA
COMPLEXO DE REGULAÇÃO DE PIRUVATO DESIDROGENASE
COMPLEXO III DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL
COMPLEXO MULTIENTZIMÁTICO DA BETA-OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS
DEGRADAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANO
EXPRESSÃO DE ACADM (ACIL-COENZIMA A DESIDROGENASE)
EXPRESSÃO DE ADIPONECTINA
EXPRESSÃO DE ANGPTL4 (ANGIOPOYETINA TIPO 4)
EXPRESSÃO DE CD36 ("PLATELET GLYCOPROTEIN" IV, FAT)
EXPRESSÃO DE CEBPA (PROTEÍNA DE UNIÃO À REGIÃO PROMOTORA DE LEPTINA)
EXPRESSÃO DE LEPTINA
EXPRESSÃO DE LIPOPROTEÍNA LIPASE (LPL)
EXPRESSÃO DE PERILIPINA (PLIN)
GLICÓLISE / GLUCONEOGÊNESE
HIDRÓLISE DE TRIACILGLICEROL MEDIADO PELA LIPASE SENSÍVEL A HORMÔNIOS (HSL)
METABOLISMO DO ÁCIDO ALFA-LINOLÊNICO
METABOLISMO DE ÁCIDOS 2-OXOCARBOXÍLICOS
METABOLISMO DE BUTANOATO E PROPANOATO
METABOLISMO DE CARBONO
METABOLISMO DE FRUCTOSE E MANOSE
METABOLISMO DE PURINA E PIRIMIDINAS
METABOLISMO DE PIRUVATO
METABOLISMO DE RIBOFLAVINA
METABOLISMO DE TIROSINA E FENILALANINA
METABOLISMO GLICEROLIPÍDEOS
METABOLISMO GLUTATION
METABOLISMO INOSITOL FOSFATO
METABOLISMO DE ARGININA E PROLINA
METABOLISMO DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO
SECREÇÃO DE INSULINA
SÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS (PG) E Tromboxanos (TX)
VIA DAS PENTOSAS FOSTFATO
VIA DE CONEÇÃO ENTRE 'DEGRADAÇÃO DE ÁC. GRAXOS' E 'SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE CORPOS CETÔNICOS'
VIA DE CONEÇÃO ENTRE 'METABOLISMO DO BITANOATO' E 'METABOLISMO DO PIRUVATO'
VIA DE CONEÇÃO ENTRE 'SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE CORPOS CETÔNICOS' E 'METABOLISMO DO PIRUVATO'

Anexo Tabela 6: Vias ou processo de sinalização associadas às proteínas identificadas de acordo à base de dados KEGG, GO e Pathway Interaction Database.
ADP:P2Y purinoceptor 1:G-proteína Gq
Ativação de canais GIRK/Kir3
Ativação de Gq por P2Y purinoceptor 1
Ativação de IRF7 mediado por TRAF6 na sinalização de TLR7/8 or 9
Ativação de NFkB via ZBP1 mediado por RIP
Ativação de p38 alfa/beta MAPK
Ativação de PKA
Ativação de NF-kB mediado por TRAF6
Autofosforilação de Fyn ligado a NCAM1
Catálise: fosforilação de L1 por ERK
CDKs/Ciclin B1/2/14-3-3-sigma
Complexo mTORC1 /família 14-3-3
Complexo PPARG:ácido graxo:RXRA:mediador:coativador
Downregulação da actividade transcricional de SMAD2/3:SMAD4
Downregulação de sinalização via receptor TGF-beta
Eventos de sinalização G alfa (i) e G alfa (q)
Eventos regulados por DARPP-32 (fosfoproteína neuronal regulado por dopamina e cAMP)
Expressão de genes estimulados por IFNG
Expressão de IL-8
Fosforilação de CRMPs por Cdk5
Fosforilação de L1 por ERK
Glucocorticoide/glucocorticoide receptor/hSWI/SNF
Helicases DEx/H-box ativam IFN type I e produção de citocinas inflamatórias
inducção das vias de IFN-alfa/beta mediado por RIG-I/MDA5
Inibição de crescimento axonal (Ativação RHOA)
NEK6/NEK7 fosforila NUP98
NF-kB é ativado e sinaliza supervivência
NRIF sinaliza morte celular desde o núcleo
PIP2/AP180/AP2/EPSIN
Regulação de canais TRP por mediador inflamatório
Scavenging por receptores Classe A
Sinalização de Interferon gama
Sinalização de Interleucina-1
Sinalização por ERBB2
Sinalização por Hippo
Sinalização via Integrina alfa IIB/beta3
Sinalização via receptor deTGF-beta ativa SMADs
Sistema de sinalização de fosfatidilinositol
TAK1 ativata NFkB por fosforilação e ativação do complexo IKKs
Via de sinalização de Rap1
Via de sinalização AMPK
Via de sinalização de Adipocitocina
via de sinalização de Estrogênio
Via de sinalização de GnRH
Via de sinalização de neurotrofin

Via de sinalização de NF-kappa B
Via de sinalização de oxitocina
Via de sinalização de p53
Via de sinalização de PI3K-Akt
Via de sinalização de PPAR
Via de sinalização de Ras
Via de sinalização do Cálcio
Via de sinalização do hormônio tiroideo
Via de sinalização do receptor tipo RIG-I
Via de sinalização Jak-STAT
Via de sinalização MAPK
Via de sinalização mTOR
Via de sinalização Notch
Via de sinalização VEGF

Anexo Tabela 7. Descrição das proteínas de PGLI-M provenientes das redes de interação apresentadas na figura 49

Cod. Uniprot	Abrev. Proteína	Nome e Função biológica*	PGLTB-M**
Q8TAS6	LAMB1	Laminina, beta 1 ; União a células via receptor de alta afinidade. Medeia o processo de união, migração e organização de células durante o desenvolvimento embrionário pela interação com outros componentes da matriz extracelular.	Id.
P11047	LAMC1	Laminina, gama 1 (nome antigo LAMB2); Função igual a LAMB1.	Id.
P08865	RPSA	Ribosomal protein SA ; Requerido para a ensamblagem e estabilidade da unidade ribossomal 40S. Funciona também como receptor de superfície celular da laminina. Tem um papel na adesão celular à membrana basal e na consequente ativação de vias de transdução de sinais. Participa da determinação do destino de células e da morfogênese de tecidos. Actua também como receptor para 'varios outros ligantes, incluindo proteína do prion, vírus e bactérias.	Id.
P11532	DMD	Distrofina	N.Id.
P07996	THBS1	Trombospondina 1 ; Glicoproteína adesiva que media interações célula-célula e célula-matriz. Une-se a heparina. É um ligante para CD36 e media propriedades anti-angiogênicas.	N.Id.
P02452	COL1A1	Colágeno, tipo I, alfa 1	Id.
P08123	COL1A2	Colágeno, tipo I, alfa 2	Id.
P12109	COL6A1	Colágeno, tipo IV, alfa 1 ; Colágeno VI atua como proteína de união a células.	Id.
P12110	COL6A2	Colágeno, tipo VI, alfa 2	Id.
P12111	COL6A3	Colágeno, tipo VI, alfa 2 3 ;	Id.
P15311	EZR	Ezrin ; provavelmente envolvido em conectar a membrana plasmática com estruturas complexas do citoesqueleto. Pode ser substrato de tirosina-quinases. Junto com PLEKHG6 é requerido para macropinocitose. Membro da família de proteínas ERM (ezrin-radixin-moesin). Interage com: Distroglicano, AHNAK, ACTB, ACTC1, ADORA2B, ADORA1B, ARF6, ARHGDI1, ARHGDI2, BID, CASP8 etc	Id.
P35241	RDX	Radixin ; Papel crucial na união de actina à membrana plasmática.	Id.

P26038	MSN	Moesin ; Ezrin, Radixin e Moesin: Reguladores chaves de interações membrana-cortex e de sinalização. , Moesin (“membrane-organizing extension spike protein”). Moesin se encontra na filopodia e outras protrusões membranares importantes para reconhecimento célula-célula, para sinalização e para movimento. Interage com: CD44, ARHGDI1, BCAP31, BID, CASP8, CASP10, CD46, CD93, EZR, FADD	Id.
H0YD13	CD44	CD44 (Grupo sanguíneo indiano). Também conhecido como PGP1 (glicoproteína fagocítica 1). Se une a moesina. Ativado é capaz de induzir IGF1.	Id.
Q9Y490	TLN1	Talin 1 ; provavelmente envolvido em conectar a membrana plasmática com estruturas complexas do citoesqueleto.	Id.
P18827	SDC1	Sindecano 1 ; Proteoglicano de superfície que une tanto heparin sulfato e condroitin sulfato e que liga o citoesqueleto à matriz intersticial.	Id.
O00560	SDCBP	Sintenina (proteína ligante de sindecano); Proteína adaptadora que une os sindecanos ao citoesqueleto ou componentes de sinalização. Parece ligar o fator de transcrição SOX4 ao receptor de IL5. (IL5RA). Também participa de tráfego de vesículas.	Id.
Q6MZM7	FN1	Fibronectina 1 . Interage com integrinas.	N.Id.
Q14118	DAG1***	Distroglicano 1 (“dystrophin-associated glycoprotein 1”); O complexo de distroglicano está envolvido em vários processos como montagem de laminina e membrana basal, estabilidade do sarcolema, sobrevivência celular, mielinização do nervo periférico, estrutura nodal, migração celular e polarização epitelial.	N.Id.
Q09666	AHNAK	Proteína associada à diferenciação de neuroblasto - Necessário para a diferenciação da célula neuronal. Interage com distroglicano e ezrin, AKT1, S100B, CDKN2A, XRCC4.	Id.
P06756	ITGAV	Integrina, alfa V	N.Id.
P17301	ITGA2	Integrina, alfa 2 (CD49B, subunidade alfa 2 do receptor VLA-2 receptor); Integrina alpha-2/beta-1 é um receptor para laminina, colágeno, fibronectina e E-caderina. É responsável pela adesão de plaquetas e outras células ao colágeno, pela modulação do colágeno e da expressão do gene colagenase. Participa da organização da matriz extracelular.	N.Id.
P26006	ITGA3	Integrina, alfa 3 (antígeno CD49C, subunidade alfa 3 do receptor VLA-3); Integrina alpha-3/beta-1 é um receptor para fibronectina, laminina, colágeno, epiirina, trombospondina e CSPG4. Alfa- 3/beta-1 pode mediar junto com LGALS3 a estimulação via CSPG4 da migração celular.	N.Id.

P23229	ITGA6	Integrin, alfa 6	N.Id.
P05556	ITGB1****	Integrin, beta 1 (receptor de fibronectina, , antígeno CD29)	Id.
P18084	ITGB5	Integrina, beta 5 ; Integrina alfa-V/beta-5 íeum receptor para fibronectina.	N.Id.
Q86TY5	LGALS3	Galectina . "lectin, galactoside-binding, soluble, 3";lectina que liga IgE. Interage com integrina alfa 3, beta 1. Envolvida na resposta inflamatória aguda	Id.
P50570	DNM2	Dinamina 2 ; Proteína associada a micro-túbulos. Participa do tráfego de vesículas durante a endocitose.	Id.
Q14677	CLINT1	Proteína que interage com clatrina ; Se une a membranas enriquecidas em fosfatidilinositol 4,5- bisfosfato (PtdIns(4,5)P2). Pode ter um papel no transporte de vesículas revestidas de clatrina desde a rede trans-Golgi aos endossomos. Estimula a montagem de clatrina	Id.
H7C218	ILKAP	Integrina ligada aa quinase e associada a serino treonina fosfatase Fosfatase que regula a progressão do ciclo celular e a proliferação celular pela desfosforilação dos seus substratos.Inibe a via de sinalização ILK-GSK3B.	N.Id.
Q13492	PICALM	Proteína agregadora de clatrina e ligadora de fosfatidil inositol ; A Proteína de montagem que recruta clatrina e o complexo AP2 para a membrana da célula nos sítios de formação de vesículas revestidas . Regula o tamanho da rede poliédrica de clatrina. Envolvido em endocitose dependente de clatrina mediado por AP2 na junção neuromuscular.	N.Id.
P62753	RPS6	Ribosomal protein S6 ; Participa do controle de crescimento celular e proliferação pela tradução seletiva de determinados mRNAs.	Id.
Q00610	CLTC	Clatrina, cadeia pesada C ; Clatrina é a proteína principal forma uma rede poliédrica que reveste vesículas	Id.
P09496	CLTA	Clatrina, cadeia leve A ; Clatrina é a proteína principal forma uma rede poliédrica que reveste vesículas	Id.
Q10567	AP1B1	Subunidade beta 1 do complexo AP-1 associado a clatrina que tem um papel na distribuição de proteínas Golgi tardio/trans-Golgi network (TGN) e/ou endossomos. Os complexos AP complexos medeia o recrutamento de clatrina a membranas	Id.
Q9BXS5	AP1M1	Subunidade mu 1 de AP-1 associado a clatrina que tem um papel na distribuição de proteínas trans-Golgi network (TGN) e/ou endossomos. Os complexos AP medeiam o recrutamento de clatrina a membranas.	N.Id.

O95782	AP2A1	Componente alfa 1 do AP-2. Complexo de proteína Adaptadora que participa em transporte de proteínas via vesícula em diferentes via de tráfego membranar, participam da seleção da proteína a ser transportada e da formação da vesícula. AP-2 está envolvido na endocitose dependente de clatrina	N.Id.
P63010	AP2B1	Componente beta do AP-2.	Id.
C9JTK4	AP2M1	Componente mu 1 do AP-2	N.Id.
P31146	CORO1A	Coronina, proteína ligante de actina, 1A. Componente importante do citoesqueleto, participa da invaginação ou protrusão da membrana plasmática. Em células infectadas por micobacterias, sua retenção na membrana fagosomal previne a fusão fagolissossomal.	Id.
P51149	RAB7A	Membro da família RAS. Regulador do tráfego endo-lissossomal. Governa a maturação do endossoma precoce ao tardio. Participa de transdução de sinal associado a fator de crescimento, nutrient- transportor mediated nutrient uptake, transporte de neurotrofina nos axônios e metabolismo lipídico.	Id.
P21281	ATP6V1B2	Transporte deH+ lissossomal	Id.
P61421	ATP6V0D1	Transporte deH+ lissossomal	N.Id.
Q9UI12	ATP6V1H	Transporte deH+ lissossomal	N.Id.
P21283	ATP6V1C1	Transporte deH+ lissossomal	N.Id.
P11279	LAMP1	Proteína de membrana associada a lissossoma 1; ligantes carboidratos a selectinas	N.Id.
P13473	LAMP2	Proteína de membrana associada a lissossoma 2. Protégé a membrana lissossomal da autodigestão. Mantain o pH ácido. participa de sinal de transdução.	N.Id.
P68133	ACTA	Actina alfa	N.Id.

* Função biológica obtida de StringV.10

**Id. -Identificada / N.Id. - Não identificada

***Esta proteína não foi identificada em PGLI-M e PGLTB-M

**** Esta proteína em PGLTB-M não obedeceu os critérios de quantificação por XIC

Anexo Tabela 8

Cod. Uniprot	Nome	Comprimento_ Proteina (#AA)	Peso Molecular
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	556	60287.6
Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	4646	532053.8
Q9UJZ1	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	356	38492.2
Q9H9B4	Sideroflexin-1	322	35578.3
O14980	Exportin-1	1071	123288.1
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	4128	468769.9
O95336	6-phosphogluconolactonase	258	27511.5
O94804	Serine/threonine-protein kinase 10	968	112047.1
Q14697	Isoform 2 of Neutral alpha-glucosidase AB	966	109351
Q15738	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	373	41855.6
P53618	Coatomer subunit beta	953	107055.7
P30084	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	290	31349.1
P61026	Ras-related protein Rab-10	200	22508.6
Q13501	Sequestosome-1	440	47638.9
O75533	Splicing factor 3B subunit 1	1304	145720.1
Q02790	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	459	51754.1
Q96HY6	DDRGK domain-containing protein 1	314	35571.5
B9EG90	Topoisomerase (DNA) I	765	90624.9
Q8NBJ5	Procollagen galactosyltransferase 1	622	71572.5
Q8TC12	Retinol dehydrogenase 11	318	35345.4
P35998	26S protease regulatory subunit 7	433	48585.1
P42677	40S ribosomal protein S27	84	9436.8
Q6P1J9	Parafibromin	531	60521.1
O60568	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	738	84713.5
P17676	CCAAT/enhancer-binding protein beta	345	36065.1
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	2136	244334.6
E5RK69	Annexin	460	51726.2
B2R7Y0	cDNA, FLJ93654, highly similar to Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (SERPINB2), mRNA	415	46563.2
Q9Y6D5	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2	1785	201891.1
Q9UB11	COMM domain-containing protein 3	195	22119.1
P01023	Alpha-2-macroglobulin	1474	163169.9

Proteínas identificadas por MS/MS apenas em PGLI-M

Q15818	Neuronal pentraxin-1	432	47074.8
P17301	Integrin alpha-2	1181	129195.8
P49915	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	693	76648.9
Q9UMS4	Pre-mRNA-processing factor 19	504	55128.3
Q5JP53	Tubulin beta chain	426	47718
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, isoform CRA_d	463	51168.5
Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1	740	82361.7
P04844	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	631	69223
Q16881	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	649	70844.2
P35606	Isoform 2 of Coatomer subunit beta'	877	98965.6
P22392	Isoform 3 of Nucleoside diphosphate kinase B	267	30099.6
Q2Q9H2	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (Fragment)	475	54771.8
Q8WUI6	COPG protein (Fragment)	699	78087.5
B4DM10	cDNA FLJ58263, highly similar to Microtubule-associated protein 4	740	79488.9
G3V576	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	231	25223.1
P18085	ADP-ribosylation factor 4	180	20479.7
Q9NZ08	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (Fragment)	941	107145.3
Q15155	Nodal modulator 3	1100	121925
Q14764	Major vault protein	893	99247.9
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	324	35884.7
P63010	AP-2 complex subunit beta	937	104468
B4DY28	cDNA FLJ61189, highly similar to Cysteine and glycine-rich protein 1	187	20010.4
Q9HDC9	Isoform 2 of Adipocyte plasma membrane-associated protein	289	32122.7
J3KTF8	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (Fragment)	194	21583
Q16666	Gamma-interferon-inducible protein 16	785	88181.4
P61421	V-type proton ATPase subunit d 1	351	40285.2
P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase	919	103192.7
P61224	Isoform 3 of Ras-related protein Rap-1b	165	18748.6
A8KAK1	cDNA FLJ77398, highly similar to Homo sapiens UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1, transcript variant 2, mRNA	1531	174878.9
E9PNR9	Protein arginine N-methyltransferase 1 (Fragment)	160	18267.3
P25205	Isoform 2 of DNA replication licensing factor MCM3	853	95830.4
B4DJQ5	cDNA FLJ59211, highly similar to Glucosidase 2 subunit beta	535	60078.2
Q15185	Isoform 4 of Prostaglandin E synthase 3	139	16447.6

Proteínas identificadas por MS/MS apenas em PGLI-M

Q5JWF2	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	1037	110937.5
H0YIZ1	Niemann-Pick disease, type C2, isoform CRA_a	151	16541.5
P62495	Isoform 2 of Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	404	45416.3
O95302	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	570	63025.5
O95782	AP-2 complex subunit alpha-1	977	107459.7
Q8N766	ER membrane protein complex subunit 1	993	111671.1
Q9Y5M8	Signal recognition particle receptor subunit beta	271	29665.8
P56192	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic	900	101033.9
P68036	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	154	17832.2
E1NZA1	Peroxisome proliferator activated receptor interacting complex protein	2671	292540.4
B7Z2R9	cDNA FLJ52540, highly similar to Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	300	32940.8
J3QT54	Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 7 (Fragment)	205	22744.4
F5H6I7	Atlastin-3	523	58717.5
B4E2Z3	cDNA FLJ54090, highly similar to 4F2 cell-surface antigen heavy chain	511	55886.7
S4R3Z2	Aldo-keto reductase family 1 member C3	300	34299.7
O75390	Citrate synthase, mitochondrial	466	51661.5
Q1JUQ3	FK506 binding protein12	37	3944.9
Q53GB3	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b isoform 1 variant (Fragment)	256	28800.3
Q5JTV8	Isoform 3 of Torsin-1A-interacting protein 1	584	66261.3
P24666	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	158	18012.8
P68402	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	229	25535.1
O75821	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	320	35570.9
M0R3D6	60S ribosomal protein L18a (Fragment)	141	16685.8
Q6PIU2	Neutral cholesterol ester hydrolase 1	408	45760.7
Q969X5	Isoform 2 of Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1	198	22128.2
P53992	Protein transport protein Sec24C	1094	118231.1
P42224	Isoform Beta of Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	712	82972.5
A8K7T0	Kynureninase	465	52317.2
C9JRH2	Regulator of chromosome condensation (Fragment)	230	24431.6
D3DVQ1	Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1, isoform CRA_a	559	63483.6
P33991	DNA replication licensing factor MCM4	863	96479.6
Q5W0J0	Ras-related protein Rab-18	161	17994
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A	1270	140851.1

Proteínas identificadas por MS/MS apenas em PGLI-M

P49790	Isoform 3 of Nuclear pore complex protein Nup153	1506	157222.1
O75694	Nucleoporin 155kDa, isoform CRA_a	1391	155082.3
Q96GX3	KIAA0118 protein (Fragment)	175	19317.7
Q9NZM1	Myoferlin	2061	234542.6
O14579	Coatomer subunit epsilon	307	34470.4
K7ENX8	Cold-inducible RNA-binding protein (Fragment)	80	8890.3
Q8WYJ5	Protein kinase C inhibitor-2	128	13891.4
A7YDK7	Aryl hydrocarbon receptor interacting protein (Fragment)	50	5484
H0YJ63	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 (Fragment)	90	10120.1
B5MCW2	60S ribosomal protein L3 (Fragment)	272	31205.6
C9JHF5	Mitochondrial fission factor (Fragment)	138	15599.1
Q8TCT9	Minor histocompatibility antigen H13	377	41443.5
C9JTK4	AP-2 complex subunit mu (Fragment)	160	18294.4
B7Z7G7	Vacuolar protein sorting-associated protein 45	198	22961.9
F5GYR3	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase (Fragment)	275	30533.1
Q9ULA0	Aspartyl aminopeptidase	475	52376.9
H7BY36	RNA-binding protein EWS (Fragment)	308	32145.5
P50579	Isoform 2 of Methionine aminopeptidase 2	455	50459.8
H3BS70	Enoyl-CoA delta isomerase 1, mitochondrial (Fragment)	224	24670.8
A0JLQ5	BXDC2 protein (Fragment)	335	39126.9
Q5U000	Cathepsin Z	303	33828.2
Q15005	Signal peptidase complex subunit 2	227	25055.8
X6R9L0	DnaJ homolog subfamily C member 3	453	51861.3
P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	445	52169.4
Q8NE71	Isoform 2 of ATP-binding cassette sub-family F member 1	807	91605.5
Q3B7X1	TMX3 protein (Fragment)	423	48509.6
Q9NX63	MICOS complex subunit MIC19	227	26118.2
Q9BUJ2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	856	95661.3
J3QS48	Mannose-P-dolichol utilization defect 1 protein	101	10953.1
K7EKW4	Isochorismatase domain-containing protein 2, mitochondrial (Fragment)	178	19378.2
J3QQY2	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1	104	11346.8
F6RFD5	Dextrin	135	15368.9
F8W727	Ribosomal protein L32, isoform CRA_a	135	15831.8
Q9Y680	Isoform 2 of Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP7	222	25759.9

Proteínas identificadas por MS/MS apenas em PGLI-M

H3BMS6	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial (Fragment)	181	20025.3
B4DWB5	cDNA FLJ53931, highly similar to Bifunctional 3'-phosphoadenosine5'-phosphosulfate synthetase 2	618	69969.8
B4E0J3	cDNA FLJ58965, highly similar to Nonspecific lipid-transfer protein (EC 2.3.1.176)	121	13012.5
B4DM30	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 38, isoform CRA_d	900	102101.7
B4DR88	cDNA FLJ58252, highly similar to Homo sapiens DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40 (DHX40), mRNA	631	72126.4
B4E2Y4	cDNA FLJ52462, moderately similar to Mus musculus proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8 (Psm8), mRNA	217	23814.5
Q13619	Cullin-4A	759	87606.4
Q93020	GTP-binding regulatory protein Gi alpha-2 chain (Fragment)	197	22068
Q08380	Galectin-3-binding protein	585	65271.3
H3BP71	Ring finger protein 40, isoform CRA_a	1001	113590.6
P48047	ATP synthase subunit O, mitochondrial	213	23244.6
Q6MZL5	Putative uncharacterized protein DKFZp686C06243 (Fragment)	1694	195506.6
O75400	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	957	108718.6
B4DT97	cDNA FLJ56931, highly similar to Peroxisomal carnitine O-octanoyltransferase (EC 2.3.1.137)	457	51886.9
P24468	Isoform 3 of COUP transcription factor 2	261	29125.8
K7ER18	Uncharacterized protein	161	17823.1
Q9BZE4	Isoform 2 of Nucleolar GTP-binding protein 1	587	68211.7
H3BQQ9	SUMO-conjugating enzyme UBC9 (Fragment)	137	15487.9
Q9BQ52	Isoform 2 of Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2	501	56040.9
C9JP00	Muscleblind-like protein 1	348	37855.9
F5GX77	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein	106	11946.3
J3KTL8	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1 (Fragment)	1388	155531.4
Q6NUK1	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-1	477	53302.3
E7EV99	Alpha-adducin	632	69994.3
Q9BWS9	Isoform 3 of Chitinase domain-containing protein 1	362	41633.4
O75521	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	364	40139.6
P30046	D-dopachrome decarboxylase	118	12685.7
E9PS97	Alpha-parvin (Fragment)	209	23587.4
Q9P016	Thymocyte nuclear protein 1	225	25663
P62854	40S ribosomal protein S26	115	12989.1

Proteínas identificadas por MS/MS apenas em PGLI-M

B4E3T7	Nucleoporin 133kDa, isoform CRA_a	981	110428.5
Q27J81	Inverted formin-2	1249	135521.7
P06756	Isoform 2 of Integrin alpha-V	1012	112168.7
F5H7R9	Parathymosin (Fragment)	57	6232.3
Q32P42	RAD50 protein (Fragment)	723	83984.6
O00754	Isoform 2 of Lysosomal alpha-mannosidase	1010	113526.3
H0YL43	Reticulocalbin-2 (Fragment)	155	17693.5
O60271	Isoform 3 of C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	945	104654
B4DRW8	cDNA FLJ54537, highly similar to Homo sapiens pitrilysin metalloproteinase 1 (PITRM1), mRNA	972	109691.4
Q5CZ91	Methionine aminopeptidase 1	336	37779.6
Q9BT78	Isoform 2 of COP9 signalosome complex subunit 4	352	40153.7
D6RDY6	Signal recognition particle subunit SRP72 (Fragment)	357	39624.6
A8K559	cDNA FLJ76187	469	51069.9
P49821	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	464	50766.8
B4DY87	Succinyl-CoA ligase subunit beta	329	36007.7
A5YKK6	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	2376	266749.9
Q15067	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	660	74358.2
Q16836	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	314	34253.9
Q86VS8	Protein Hook homolog 3	718	83056.4
Q0ZAJ1	MSH2-Ex5 isoform (Fragment)	101	11671
B3KMI3	Spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome), isoform CRA_b	440	48773.4
Q6PKG0	La-related protein 1	1096	123416.2
Q5TEJ7	Replication protein A 32 kDa subunit (Fragment)	179	19402.6
O15260	Isoform 3 of Surfeit locus protein 4	128	14826.5
Q6PJT7	Zinc finger CCCH domain-containing protein 14 (Fragment)	148	16760.8
Q15370	Transcription elongation factor B polypeptide 2	118	13106.5
Q96C90	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B	147	15883
K7ERJ1	Thymidine kinase (Fragment)	187	20494.6
Q9NSY5	Putative uncharacterized protein DKFZp434L1613	144	16469.9
H0Y9R4	60S ribosomal protein L9 (Fragment)	91	10134.3
Q03001	Dystonin	7570	860109.3
K7EMR1	Granulins (Fragment)	172	18039.2
Q9BXP5	Serrate RNA effector molecule homolog	876	100586.3

Proteínas identificadas por MS/MS apenas em PGLI-M

Q96QD8	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2	506	55971.5
H0YB37	Tetratricopeptide repeat protein 1 (Fragment)	163	18871.6
C9JR83	Structural maintenance of chromosomes protein 4 (Fragment)	423	48281.8
Q9H6R4	Nucleolar protein 6	200	22171.5
D6RHC4	Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1 (Fragment)	368	37483.2
B2R8A2	cDNA, FLJ93804, highly similar to Homo sapiens gp25L2 protein (HSGP25L2G), mRNA	214	25043.9
K7EIU4	KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 2 (Fragment)	221	24034.1
P05556	Integrin beta-1	798	88339
P06730	Isoform 3 of Eukaryotic translation initiation factor 4E	237	27224.6
Q9HBR7	Propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide, isoform CRA_a	302	32838.3
Q7Z7H5	Isoform 3 of Transmembrane emp24 domain-containing protein 4	186	20749.6
Q68DX9	Putative uncharacterized protein DKFZp686M05161	1267	142467.1
E7ETM8	Nexilin (Fragment)	321	38347.5
Q15648	Isoform 2 of Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1	556	61505.5
H3BS02	[3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase [lipoamide]] kinase, mitochondrial	217	24415
J3QLE5	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N (Fragment)	169	17517.3
Q01130	Serine/arginine-rich splicing factor 2	221	25443.2
Q9BRP4	Isoform 3 of Proteasomal ATPase-associated factor 1	277	29945
Q9HAN9	Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase 1	279	31894.6
P02671	Fibrinogen alpha chain	866	94896.4
P11532	Isoform 2 of Dystrophin	2341	270854.2
Q9UHD8	Isoform 5 of Septin-9	579	64623.3
Q9BSJ8	Extended synaptotagmin-1	1104	122761.9
P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon	541	59614.8
P55084	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	474	51243.5
P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	168	19636.3
Q9Y230	Isoform 2 of RuvB-like 2	418	46259
Q9UHB6	Isoform 5 of LIM domain and actin-binding protein 1	600	67058.1
O95793	Double-stranded RNA-binding protein Staufeu homolog 1	577	63124.7
P78344	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	907	102278.8
Q53HC2	Peroxiredoxin 3 isoform a variant (Fragment)	256	27589.2
P30048	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	256	27657.2
Q9Y3B3	Isoform 2 of Transmembrane emp24 domain-containing protein 7	188	21201.4
P16435	NADPH--cytochrome P450 reductase	677	76623.2

Proteínas identificadas por MS/MS apenas em PGLI-M

P23229	Isoform 7 of Integrin alpha-6	954	106492.3
Q09161	Nuclear cap binding protein subunit 1, 80kDa, isoform CRA_a	790	91762.5
P61769	Beta-2-microglobulin	119	13687.9
O94905	Erlin-2	339	37797.4
O95571	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial	254	27837.1
Q9BUQ8	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	820	95505.9
P10301	Ras-related protein R-Ras	218	23447.9
B7Z592	cDNA FLJ61635, highly similar to Homo sapiens likely ortholog of mouse immediate early response, erythropoietin 4 (LEREPO4), mRNA	392	44845
P58335	Isoform 2 of Anthrax toxin receptor 2	386	42847.7
O94776	Metastasis associated 1 family, member 2, isoform CRA_a	668	74957.7
Q8TAT6	Nuclear protein localization protein 4 homolog	608	68058.9
K7EL62	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 (Fragment)	236	27400.1
K7ES69	Calponin-2	148	16469.3
O43237	Isoform 2 of Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	415	44958.8
Q16531	DNA damage-binding protein 1	1140	126869.3
P35251	Replication factor C subunit 1	1148	128157
P07919	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	91	10713.9
A8MU58	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	242	26724.9
D5KJA2	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4 like 2A	140	15153.9
Q59GY3	Arginine/serine-rich splicing factor 6 variant (Fragment)	279	31828.1
P83731	60S ribosomal protein L24	157	17749.9
F5GXJ9	CD166 antigen	532	59473.3
B3KMK0	cDNA FLJ11217 fis, clone PLACE1008044, highly similar to NUCLEAR PORE COMPLEX PROTEIN NUP107	593	69144.1
Q9UHX1	Isoform 6 of Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	513	55346.4
Q16222	Isoform 3 of UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	521	58626.8
B4DF38	cDNA FLJ52123, highly similar to Platelet-activating factor acetylhydrolase IB alpha subunit	205	23384.4
Q6I9R8	FHL2 protein	279	32152.6
Q7Z434	Isoform 5 of Mitochondrial antiviral-signaling protein	124	14358.1
P67775	Isoform 2 of Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	255	29697.7
Q4ZG72	Putative uncharacterized protein DDX18 (Fragment)	546	61538.1
Q9NZN4	EH domain-containing protein 2	543	61104.7
P46783	40S ribosomal protein S10	165	18867.9

Proteínas identificadas por MS/MS apenas em PGLI-M

P30154	Isoform 5 of Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform	474	52162.3
B7Z2E2	cDNA FLJ54671, highly similar to Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	567	62229.6
B4DZ87	cDNA FLJ57240, highly similar to Mitochondrial proteins import receptor	501	56876.5
C9IZ01	Elongation factor G, mitochondrial	591	65974.8
B2RAH7	cDNA, FLJ94921, highly similar to Homo sapiens prolyl endopeptidase (PREP), mRNA	710	80664
E5RI99	60S ribosomal protein L30 (Fragment)	114	12629.6
Q9NUJ1	Isoform 2 of Mycophenolic acid acyl-glucuronide esterase, mitochondrial	149	16880.8
B3KRJ9	cDNA FLJ34439 fis, clone HLUNG2001146, highly similar to Splicing factor, arginine/serine-rich 12	514	58149.4
Q96K98	cDNA FLJ14414 fis, clone HEMBA1004847, highly similar to SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 68 KD PROTEIN	327	37175.4
Q6P587	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial	224	24808.7
O75165	DnaJ homolog subfamily C member 13	2243	254234.4
Q8IVF2	Isoform 3 of Protein AHNAK2	5695	605250.3
P55769	NHP2-like protein 1	128	14146.5
Q86X76	Isoform 6 of Nitrilase homolog 1	243	26291.2
K7EJ83	Cyclin-dependent kinase 3 (Fragment)	213	24409
Q9UNW1	Isoform 3 of Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1	284	31437.3
Q8N8U9	BMP-binding endothelial regulator protein	685	75926.7
P23381	Isoform 2 of Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	430	48802.4
B4DRV4	cDNA FLJ55667, highly similar to Secreted protein acidic and rich in cysteine	212	24668.1
P55060	Exportin-2	971	110328.3
P16104	Histone H2AX	143	15117.4
Q658U4	Putative uncharacterized protein DKFZp666D193	582	64073.1
B7ZLE5	FN1 protein	2193	240474.4
P07686	Beta-hexosaminidase subunit beta	556	63053.2
B3KY12	cDNA FLJ46581 fis, clone THYMU3043200, highly similar to Splicing factor 3A subunit 3	501	58722.2
Q14677	Clathrin interactor 1	625	68197.8
Q5HYD9	Putative uncharacterized protein DKFZp686M0619 (Fragment)	107	11847.8
MQXF7	Myeloid-derived growth factor (Fragment)	84	9648.6
B3KVN0	cDNA FLJ16785 fis, clone NT2RI2015342, highly similar to Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	416	45821.2
Q9Y3A5	Ribosome maturation protein SBDS	250	28828.3
B7Z238	cDNA FLJ55839, highly similar to Bcl-2-like 13 protein	361	38941.7

Proteínas identificadas por MS/MS apenas em PGLI-M

B4DVK5	cDNA FLJ54759, highly similar to DNA replication licensing factor MCM5	412	44933.9
H7C0R7	NADH-cytochrome b5 reductase 1 (Fragment)	226	24873.2
B4DFQ5	cDNA FLJ58134, highly similar to Cleavage stimulation factor 77 kDa subunit	625	72121.1
P52948	Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96	1817	197438.6
O15042	Isoform 3 of U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	620	72460.7
Q92626	Isoform 2 of Peroxidasin homolog	727	80260.9
Q9NW13	Isoform 2 of RNA-binding protein 28	618	69862.2
P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	2491	274180.7
P61009	Signal peptidase complex subunit 3	180	20282.5
G5E9W3	Cleavage and polyadenylation specific factor 3, 73kDa, isoform CRA_b	647	73412
Q16270	Insulin-like growth factor binding protein 7, isoform CRA_a (Fragment)	194	20320.3
Q53SY7	Putative uncharacterized protein CAD (Fragment)	2151	235010.6
Q14165	Malectin	292	32195.6
Q9BV79	Isoform 2 of Trans-2-enoyl-CoA reductase, mitochondrial	297	32189.7
P11047	Laminin, gamma 1 (Formerly LAMB2), isoform CRA_a	1573	173881.6

Anexo Tabela 9

Cod. Uniprot	Nome	Comprimento Proteína (#AA)	Peso Molecular
P47985	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	274	29631.4
Q12788	Transducin beta-like protein 3	808	88960.5
Q7Z4Q2	HEAT repeat-containing protein 3	680	74517
P14854	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	86	10167.7
Q14315	Filamin-C	2725	290822.6
O75369	Filamin-B	2602	277972
B7ZAF0	cDNA, FLJ79164, highly similar to Tubulin beta-7 chain	415	46518.5
A3RJH1	ATP-dependent RNA helicase DDX1	740	82361.7
Q96QV6	Histone H2A type 1-A	131	14206.9
Q14697	Neutral alpha-glucosidase AB	944	106788.6
V9HWJ0	Epididymis secretory sperm binding protein Li 164nA	944	106788.6
P48643	Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit epsilon	448	49476.8
Q8N4H5	Mitochondrial import receptor subunit TOM5 homolog	51	6013.4
F5GY03	SPARC (Fragment)	149	17440.5
Q16881	Isoform 7 of Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	461	50823.9
F8WDD7	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	113	13031
P22392	Nucleoside diphosphate kinase B	152	17268.9
Q9BTA4	Similar to cysteine and glycine-rich protein 1 (Fragment)	168	17792.5
Q0PHS1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (Fragment)	297	33917
Q6PKI6	YBX1 protein (Fragment)	266	29338.7
Q9UJZ1	Isoform 2 of Stomatin-like protein 2, mitochondrial	311	33298.6
Q6NX68	MAP4 protein (Fragment)	492	53444.6
J3KRE2	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	129	14787.2
P61224	Isoform 2 of Ras-related protein Rap-1b	137	15327.9
C9JAK5	ADP-ribosylation factor 4	153	17670
B3KY56	cDNA FLJ46898 fis, clone UTERU3022168, highly similar to Protein FAM62A	1058	117302.2
A2VCQ4	PRKCSH protein (Fragment)	181	20234.9
Q6PKD2	HNRPCL1 protein (Fragment)	207	22619.8
P46777	60S ribosomal protein L5	297	34322.7
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	367	39281.7

Proteínas identificadas apenas em PGLTB-M

F5H282	T-complex protein 1 subunit alpha	332	36415.2
P49915	Isoform 2 of GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	594	65869.5
B4DJV2	Citrate synthase	453	50381.7
F8W031	Uncharacterized protein (Fragment)	263	29187.9
P62195	26S protease regulatory subunit 8	406	45579
H0YBN9	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform (Fragment)	52	6077
H7C4H2	Signal recognition particle receptor subunit beta (Fragment)	160	17586.4
B7Z1X9	cDNA FLJ53726, highly similar to Coiled-coil-helix-coiled-coil-helixdomain-containing protein 3	138	15584.2
D6RFI0	Sideroflexin-1 (Fragment)	194	21472.9
A6XMH5	Beta-2-microglobulin	92	10374.4
P68402	Isoform 3 of Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	132	14860.4
B4DNN2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4, isoform CRA_b	222	24921.8
Q96AB3	Isoform 3 of Isochorismatase domain-containing protein 2, mitochondrial	135	14737.8
M0R003	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50 (Fragment)	257	28187.6
E5RG31	DNA replication licensing factor MCM4 (Fragment)	279	31652.6
H3BQK6	Major vault protein (Fragment)	220	25076.1
H0YHV5	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic (Fragment)	233	26665.4
B4DW90	cDNA FLJ58737, highly similar to Splicing factor 3A subunit 3	448	52377.1
B7Z1V9	cDNA FLJ53310, highly similar to Puromycin-sensitive aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	473	53100.5
Q8IY44	CTBP2 protein	513	56147.5
Q96IJ6	GDP-mannose pyrophosphorylase A, isoform CRA_a	420	46244.1
B4DMT5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	307	33201
Q32P28	Isoform 3 of Prolyl 3-hydroxylase 1	804	90540.8
Q8IV08	Phospholipase D family, member 3, isoform CRA_b	490	54652.5
B4E233	cDNA FLJ53594, highly similar to Muscblind-like protein	301	31624.9
B4DUQ9	cDNA FLJ50873, highly similar to DNA replication licensing factor MCM3	762	85567.3
V9HWB7	Aconitate hydratase	889	98318.6
B4DFP1	cDNA FLJ51818, highly similar to Phosphoglucomutase-1 (EC 5.4.2.2)	538	58684
B4E0S6	cDNA FLJ55635, highly similar to pre-mRNA-splicing factorATP-dependent RNA helicase DHX15 (EC 3.6.1.-)	784	89472.5
P55265	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	1226	135962.9
H0YDG7	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform (Fragment)	224	24723.2
H0Y4R4	Torsin-1A-interacting protein 1 (Fragment)	296	33714

Proteínas identificadas apenas em PGLTB-M

E9PRB9	Signal peptidase complex subunit 2	87	10138.3
R4GNF2	COMM domain-containing protein 3 (Fragment)	74	8580.3
B7Z438	cDNA FLJ56352, highly similar to Succinyl-CoA ligase (GDP-forming) subunit alpha, mitochondrial	248	26440.7
C9JXC1	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 (Fragment)	289	33749.1
F2Z2Q9	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	70	7477.8
I3L2R3	Nuclear distribution protein nudE homolog 1 (Fragment)	137	14163.6
E9PFF2	Transketolase	334	36408.3
Q32XH3	Ribosomal protein L18a-like protein	136	15763.1
B4DN06	Ribosomal protein L3, isoform CRA_i	122	13889.4
E9PIZ4	Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	116	13116.4
J3KPY9	Anthrax toxin receptor 2	411	44794.6
F2Z388	60S ribosomal protein L35	96	10620
P43686	Isoform 2 of 26S protease regulatory subunit 6B	387	43462.5
P30086	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	187	21025.7
B3KMA8	Methyl-CpG-binding domain protein 3 (Fragment)	130	14432.5
H0YNX5	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11 (Fragment)	106	11960.4
F5H895	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1	65	7265.8
E9PLD2	Mitochondrial fission regulator 1-like	195	21159.6
Q27J81	Isoform 3 of Inverted formin-2	234	25919.5
Q9NUP3	cDNA FLJ11224 fis, clone PLACE1008273, moderately similar to COATOMER GAMMA SUBUNIT	483	53971.7
C9J0J7	Profilin-2	91	9816.1
B4DJQ7	cDNA FLJ60602, moderately similar to D-dopachrome decarboxylase (EC 4.1.1.84)	112	11649.8
J3QRS2	Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2 (Fragment)	122	13859.2
E5RJT0	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H (Fragment)	244	28339.4
E5RI99	60S ribosomal protein L30	51	5533.7
P30520	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	456	50047.8
E7EW15	TNFAIP3-interacting protein 1 (Fragment)	257	27791.2
P35250	Replication factor C subunit 2	354	39114.1
Q96ER3	Protein SAAL1	474	53505.7
D6RDM7	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K (Fragment)	123	14008.2
Q8NDD7	Putative uncharacterized protein DKFZp564M063 (Fragment)	561	63462.2
E5RHS5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E (Fragment)	226	26600.7

Proteínas identificadas apenas em PGLTB-M

G3V4Z4	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	252	26989.8
Q6PIU2	Isoform 3 of Neutral cholesterol ester hydrolase 1	275	31130.1
Q96HY6	DDRGK domain-containing protein 1	298	33900.6
Q2I0Y7	Casein kinase 2 alpha isoform	385	45233.9
B4DHS3	cDNA FLJ57984, highly similar to Nucleolysin TIAR	181	20349.2
O00764	Pyridoxal kinase	312	35061.9
Q5TA02	Glutathione S-transferase omega-1 (Fragment)	200	23308
B3KUH4	cDNA FLJ39909 fis, clone SPLEN2017918, highly similar to EH-domain-containing protein 2	342	38639.2
Q96B43	Methionine aminopeptidase (Fragment)	253	28194
H3BRM8	Cirhin (Fragment)	211	23192
Q07960	Rho GTPase-activating protein 1	439	50386.2
E5KLJ5	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	1015	117652.1
P08243	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	561	64310.6
H0Y903	Methionine aminopeptidase 1 (Fragment)	116	13120.3
B2R6A7	Glucosylceramidase	487	54365.3
Q9NYK5	Isoform 2 of 39S ribosomal protein L39, mitochondrial	353	40413.7
Q99640	Isoform 2 of Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase	480	52094.6
P00390	Isoform 3 of Glutathione reductase, mitochondrial	469	50446.8
C9JPK5	Integrin beta (Fragment)	98	11236.8
B4DIX0	cDNA FLJ50778, highly similar to Protein flightless-1 homolog	1238	141373.9
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	654	72270.4
Q9UHD8	Septin-9	586	65342.8
P55084	Isoform 2 of Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	452	48830.2
P02751	Fibronectin	2386	262442.1
A8K6Q8	cDNA FLJ75881, highly similar to Homo sapiens transferrin receptor (p90, CD71) (TFRC), mRNA	760	84801.9
P62750	60S ribosomal protein L23a	156	17666.1
E9PKZ0	60S ribosomal protein L8 (Fragment)	205	22357.2
E7EMC6	Annexin	330	36921.7
P62191	Isoform 2 of 26S protease regulatory subunit 4	367	41123.2
Q8IYQ9	Importin subunit alpha	521	57846.8
F8VQE1	LIM domain and actin-binding protein 1	598	66932
Q92973	Isoform 2 of Transportin-1	890	101226.3
C9JXB8	60S ribosomal protein L24	121	14341.8

Proteínas identificadas apenas em PGLTB-M

Q53T70	Putative uncharacterized protein RAB10 (Fragment)	157	17781.1
O15511	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	151	16292.3
B4DY35	cDNA FLJ55007, highly similar to Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, mitochondrial	186	19902.7
Q9NZL4	Hsp70-binding protein 1	362	39430.5
P07954	Isoform Cytoplasmic of Fumarate hydratase, mitochondrial	467	50162.7
B4DS32	cDNA FLJ56236, highly similar to Exportin-2	569	64323.4
P11387	DNA topoisomerase 1	765	90650.9
I3L4U9	Nuclear protein localization protein 4 homolog	134	14864.8
Q4W5H3	Putative uncharacterized protein PAPSS1 (Fragment)	257	29462.8
Q8WU90	Isoform 2 of Zinc finger CCCH domain-containing protein 15	162	18917.7
P26447	Protein S100-A4	101	11702.7
O95816	BAG family molecular chaperone regulator 2	211	23739.2
K7EL89	Spermidine synthase (Fragment)	83	9300.7
B3KWV6	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1 (Fragment)	185	21130.1
Q96IZ0	PRKC apoptosis WT1 regulator protein	340	36527.4
B4DNL3	cDNA FLJ53145, highly similar to Ankycorbin (Fragment)	659	74479
C9JDR0	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating (Fragment)	254	28110.4
M0QXN5	HCG19665, isoform CRA_a	522	53204.5
P35998	Isoform 2 of 26S protease regulatory subunit 7	296	33234.2
P55809	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial	520	56103.9
Q96KP4	Isoform 2 of Cytosolic non-specific dipeptidase	391	43787.3
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	843	96616.5
O60841	Eukaryotic translation initiation factor 5B	1220	138578.7
Q9NSE4	Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial	1012	113701.1
P26640	Valine--tRNA ligase	1264	140369.4
Q53EY4	RAB31, member RAS oncogene family variant (Fragment)	195	21653.9
P09669	Cytochrome c oxidase subunit 6C	75	8757.7
Q5JQ44	Putative uncharacterized protein DKFZp547A0616 (Fragment)	181	20263.1
Q9UNF0	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	486	55685.9
P11047	Laminin, gamma 1 (Formerly LAMB2), isoform CRA_a	1573	173881.6
O00483	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4	81	9345.9
Q9UBB4	Ataxin-10	475	53436.8