

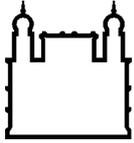
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

ANÁLISE COMPARATIVA DO SECRETOMA DE CEPAS DE *Leishmania (Viannia)*
braziliensis ISOLADAS DE PACIENTES COM MANIFESTAÇÕES CUTÂNEA E
DISSEMINADA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA E EFEITO DA
SECREÇÃO SOBRE A INFECÇÃO *IN VITRO* DE MACROFAGOS

CARLOS ANDRÉS RODRÍGUEZ VEGA

Rio de Janeiro
Março de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CARLOS ANDRÉS RODRÍGUEZ VEGA

Análise comparativa do secretoma de cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes com manifestações cutânea e disseminada da leishmaniose tegumentar americana e efeito da secreção sobre a infecção *in vitro* de macrófagos

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

Orientador: Prof. Dra. Patricia Cuervo Escobar

RIO DE JANEIRO

Março de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

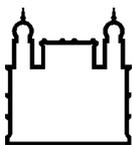
R696 Rodríguez Vega, Carlos Andrés

Análise comparativa do secretoma de cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes com manifestações cutânea e disseminada da Leishmaniose tegumentar americana e efeito da secreção sobre a infecção *in vitro* de macrófagos / Carlos Andrés Rodríguez Vega. – Rio de Janeiro, 2016.
xv, 133 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.
Bibliografia: f. 116-132

1. Leishmaniose cutânea. 2. Leishmaniose disseminada. 3. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 4. Secretome. 5. Proteômica. 6. iTRAQ. 7. LTA. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biología Celular e Molecular

AUTOR: Carlos Andrés Rodríguez Vega

**ANÁLISE COMPARATIVA DO SECRETOMA DE CEPAS DE *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis* ISOLADAS DE PACIENTES COM MANIFESTAÇÕES
CUTÂNEA E DISSEMINADA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA E
EFEITO DA SECREÇÃO SOBRE A INFECÇÃO *IN VITRO* DE MACROFAGOS**

ORIENTADOR: Prof. Dra. Patricia Cuervo Escobar

Aprovada em: ____ / ____ / ____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos - Presidente (IOC-Fiocruz)

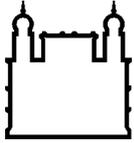
Prof. Dra. Ana Gisele da Costa Neves Ferreira (IOC-Fiocruz)

Prof. Dra. Elvira Saraiva (UFRJ)

Prof. Dr. Fabio C. S. Nogueira (UFRJ)

Prof. Dra. Marcia Berredo (Fiocruz)

Rio de Janeiro, 29 de Março de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedicatória

**A Deus e a minha família pelo seu
apoio e compreensão.**

AGRADECIMENTOS

A minha eterna amiga, irmã e companheira de luta Monica Losada, pelo seu apoio, paciência, amizade e compreensão;

Ao pesquisador e amigo Dr. Paulo Carvalho pelo seu valioso tempo, ajuda e conselhos no período do doutorado, muito obrigado;

Aos meus amigos Diogo Borgues, Priscila Aquino, Michele, Fabricio, Juliana, Camila Mesquita, Natalia e Barbara Santos pela sua enorme ajuda e paciência em diferentes momentos do meu doutorado, ainda aprendo muito de vocês;

À Ana Cristina Bombaça e Dr. Rubem Barreto pelo seu tempo, paciência e ajuda em todos os experimentos feitos;

Aos meus amigos Veronica e Luiz Berbert pela sua amizade e risadas neste período de Doutorado;

A minha orientadora Dra. Patricia Cuervo pelos seus conselhos, amizade e ajuda nesta etapa importante da minha vida, tendo paciência e sabedoria para me orientar em todo momento do meu doutorado;

A dona Gloria pela ajuda e confiança e ter sido minha mãe no Brasil;

Aos meus colegas e amigos do LPL, Camila, Fernanda, Ulises, Caroline, Amanda, Priscila, Cinthia, Leonardo e Mariana pela sua ajuda, paciência e risadas no laboratório;

Ao Dr. Renato Porrozzi e especialmente à Dra. Elisa Cupolillo pela sua compreensão e ajuda no período do doutorado, por ter aberto as portas do LPL para junto com a minha orientadora Patricia ter conseguido realizar meus experimentos, muito obrigado;

Aos meus amigos Rossane, Eduardo, Ricardo e Henrique pela sua amizade e ajuda nesses momentos importantes;

Aos meus queridos amigos Luis Castillo, Victor Romero, Andrés Castro e Pablo Ruiz pela sua amizade que embora a distância que nos afasta, posso contar com o apoio deles;

À Paula Carneiro pelo seu apoio e carinho incondicional, não tenho como te agradecer;

À Dra. Luz Mary Salazar e à Dra. Fabiola Espejo pelo seu carinho e apoio desde o começo da minha formação acadêmica, muito obrigado;

Ao meu amigo Dr. Nelson Arenas por ter sido o exemplo a seguir no caminho da ciência;

Aos meus amigos da casa Amarela Arthur, Chintia, Mario, Wellinton, por ter me ajudado nos primeiros momentos da luta junto com a Monica Losada;

Ao Laboratório de Toxinologia e a plataforma de proteômica de Fiocruz-RJ especialmente à Doutora Ana Gisele da Costa Neves e André Ferreira pelo acesso a seu laboratório e análise de amostras no espectrômetro de massas.

Ao Michel Batista, Fabricio Marchini e a plataforma de proteômica do Paraná, pela orientação e ajuda no processamento de amostras e análise de dados proteômicos.

A minha querida amiga Adriana Umaña por ter sido guia, amiga, apoio e grande conselheira nos momentos de dificuldade;

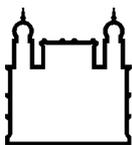
A minha mãe, Rosana Vega, pela motivação, amor e vida que tem me inspirado para continuar lutando;

Aos meus irmãos Ana Maria e Rubén Dario, pelo carinho e amizade desde crianças;

A Deus pela vida e as oportunidades de continuar pelo bom caminho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

“Oh Deus, bendito sejam os obstáculos, pela satisfação de vencê-los” Anônimo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

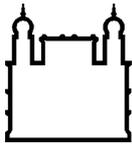
ANÁLISE COMPARATIVA DO SECRETOMA DE CEPAS DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* ISOLADAS DE PACIENTES COM MANIFESTAÇÕES CUTÂNEA E DISSEMINADA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA E EFEITO DA SECREÇÃO SOBRE A INFECÇÃO *IN VITRO* DE MACROFAGOS

RESUMO

DOUTORADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR

Carlos Andrés Rodríguez Vega

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* é caracterizada por um espectro de formas clínicas que abrange desde lesões cutâneas simples e autorresolutivas, até múltiplas lesões que envolvem a disseminação do parasito, com comprometimento da mucosa orofaríngea. O papel do parasito no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da LTA e, especificamente, no processo de disseminação metastática, ainda não está esclarecido, mas acredita-se que características intrínsecas de algumas cepas podem modular o desfecho clínico. Em espécies do gênero *Leishmania*, a sobrevivência nos hospedeiros vertebrado e invertebrado envolve intrincados mecanismos de transporte e secreção de moléculas. Algumas das proteínas secretadas por esses parasitos estão implicadas na resistência à lise pelo complemento, na resistência a quimioterápicos e na invasão e lise da célula hospedeira. Entretanto, os mecanismos de liberação e a real função da maioria das moléculas secretadas por este parasito ainda são desconhecidos. O presente estudo visou a caracterização, em larga escala, de proteínas secretadas por cepas de *L. (V.) braziliensis* associadas a duas formas clínicas polares da LTA: uma associada à forma simples autorresolutiva da doença e outra associada à forma disseminada, com a finalidade de identificar moléculas potencialmente envolvidas na disseminação do parasito. A identificação global das proteínas foi feita usando uma abordagem proteômica quantitativa, por espectrometria de massas. Os secretomas de cada cepa foram obtidos, digeridos enzimaticamente e os peptídeos foram derivatizados usando reagentes de marcação isotópica. Os peptídeos marcados de cada cepa foram misturados e analisados por espectrometria de massas. Os resultados incluíram a identificação de um total de 252 proteínas a partir de 1,176 peptídeos identificados. Das 252 proteínas identificadas, 26 foram diferencialmente abundantes, 13 “up-regulated” e 13 “down-regulated” na cepa disseminada em comparação com a cepa cutânea ($fold\ change \geq 1,5$ e $p < 0,05$). Estes resultados mostram que é viável identificar proteínas diferencialmente secretadas pelos parasitos usando a abordagem metodológica selecionada. A identidade e função das proteínas identificadas forneceram importantes informações sobre (i) os mecanismos de secreção de proteínas nestes organismos, (ii) a relação parasito-hospedeiro nos primeiros momentos da infecção, e (iii) proteínas potencialmente associadas à disseminação do parasito e/ou com as distintas formas clínicas da LTA. Adicionalmente, ensaios de infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongo pré-estimulados ou não com secreção de *L. (V.) braziliensis* demonstraram que macrófagos pré-tratados com o secretoma apresentaram um número maior de amastigotas por célula do que os macrófagos não tratados, sugerindo que as proteínas presentes na secreção de promastigotas tornam os macrófagos mais susceptíveis à infecção *in vitro*, permitindo uma maior proliferação do parasito. Além disso, análise de citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos pré-estimulados com secreção e submetidos à infecção com promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, demonstraram que as proteínas secretadas por cada cepa são capazes de modular diferencialmente a secreção de citocinas que favorecem um perfil pró-inflamatório na cepa cutânea, mas não na cepa disseminada, evidenciando o papel fundamental que têm as proteínas secretadas pelo parasito na ativação do macrófago frente à infecção com *Leishmania*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE SECRETOME OF *Leishmania (Viannia) braziliensis* STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH CUTANEOUS OR DISSEMINATED MANIFESTATION OF AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS AND EFFECTS OF THE SECRETION ON THE *IN VITRO* INFECTION OF MACROPHAGES

ABSTRACT

PHD THESIS IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

Carlos Andrés Rodríguez Vega

The American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) caused by *Leishmania (V.) braziliensis* is characterized by a spectrum of clinical forms that range from localized self-healing lesions to multiple lesions involving metastatic dissemination of the parasites compromising naso-oropharyngeal mucosa. The parasite's role in the development of ATL clinical forms, specifically in the dissemination process is not yet clear, but it is suggested that intrinsic characteristics of some strains may modulate the clinical outcome. The survival of *Leishmania* spp. in the vertebrate and invertebrate hosts involves intricate mechanisms of transport and secretion of molecules. Some proteins secreted by these parasites are involved in the resistance to lysis by complement, drug resistance, invasion or lysis of the host cell. However, the mechanisms of protein release and the function of most of the secreted molecules remain unknown. This study aimed the identification and characterization of proteins secreted by *L. (V.) braziliensis* strains associated with two polar clinical forms of ATL: one associated with localized cutaneous self-healing leishmaniasis and other associated with a disseminated form of the disease, with multiple lesions and refractory to treatment, with the purpose of identifying molecules potentially involved in parasites dissemination. Global protein identification was performed using a quantitative mass spectrometry-based proteomic approach. Secretomes from each strain were collected, enzymatically digested, and peptides were derivatized using isotopic labeling reagents. Labeled peptides from each strain were mixed and further analyzed by mass spectrometry. A total of 252 proteins were identified from 1,176 peptides. Among 252 protein identified, 26 were differentially abundant between the strains: 13 were up-regulated and 13 down-regulated in the disseminated strain compared to the cutaneous strain (fold change ≥ 1.5 and $p < 0.05$). These results show that it is feasible, through the methodological approach used here, to identify proteins differentially secreted by the parasites. The identification and functional assignment of secreted proteins shed light on (i) the protein secretion mechanisms in these parasites; (ii) the host-parasite relationship in the early stages of infection, and (iii) proteins potentially related to parasite dissemination and/or to different clinical forms of ATL. Furthermore, *in vitro* infection of mouse peritoneal macrophages pre-stimulated or not with secretion of each *L. (V.) braziliensis* strain demonstrated that pre-treated macrophages exhibited higher number of amastigotes *per* cell, as well as a higher number of infected cells, than untreated macrophages, suggesting that molecules secreted by parasites made macrophages more susceptible to infection, allowing a greater proliferation of the parasite. Analysis of pro-inflammatory cytokines secreted by pre-stimulated or non-stimulated macrophages infected with each *L. (V.) braziliensis* strain demonstrated that proteins secreted by each strain are able to differentially modulate the pattern of cytokines secreted by macrophages, favoring a pro-inflammatory profile in the cells infected with the localized cutaneous strain, but not in those infected with the disseminated strain. These results highlight the key role of parasites' secreted proteins in the activation of macrophages in response to *Leishmania* infection.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XIV
2 INTRODUÇÃO	16
2.1 <i>LEISHMANIA</i> SPP.....	16
2.2 CICLO DE VIDA DE <i>LEISHMANIA</i> SPP.	16
2.3 BIOQUÍMICA DA DIFERENCIAÇÃO.....	19
2.4 LEISHMANIOSE	20
2.4.1 <i>Leishmaniose cutânea</i>	21
2.4.2 <i>Leishmaniose mucocutânea</i>	22
2.4.3 <i>Leishmaniose visceral</i>	24
2.5 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO	24
2.6 <i>LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS</i>	26
2.6.1 <i>Genômica, transcriptômica e proteômica de L. (V.) braziliensis</i> ...	30
2.7 PROTEÔMICA	32
2.8 PROTEÍNAS MULTITAREFA.....	33
2.9 SECRETOMA E SEU PAPEL NO PROCESSO DE INFECÇÃO	34
2.10 O PROBLEMA ABORDADO NESTA TESE: A ASSOCIAÇÃO DE CEPAS DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> COM O DESENVOLVIMENTO DA MANIFESTAÇÃO CUTÂNEA OU DISSEMINADA DA LTA	39
3 JUSTIFICATIVA	41
4 OBJETIVOS	42
4.1 OBJETIVO GERAL	42
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5 MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1 CULTIVO DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> E ENSAIOS DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS..	43
5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	44

5.3 DIGESTÃO DE PROTEÍNAS, MARCAÇÃO POR ITRAQ E CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.	44
5.4 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	45
5.5 IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS E BANCO DE DADOS USADOS PARA IDENTIFICAR AS PROTEÍNAS SECRETADAS POR <i>LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS</i>	46
5.6 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR CEPAS DE <i>LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS</i> ASSOCIADAS A DISTINTAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LTA	48
5.7 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS	48
5.7.1 <i>Ontologia gênica</i>	49
5.7.2 <i>Predição de domínios, localização celular e mecanismo de secreção</i>	49
5.7.3 <i>Interactoma</i>	49
5.7.4 <i>Comparação das proteínas identificadas na secreção de L. (V.) braziliensis com o banco de dados de proteínas multitarefas</i>	50
5.8 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	50
5.9 CULTURA PRIMÁRIA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS E INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> COM <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i>	51
5.10 ANÁLISE DE CITOCINAS SECRETADAS POR MACRÓFAGOS MURINOS.....	52
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
6 RESULTADOS	54
6.1 A VIABILIDADE CELULAR DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> DURANTE OS ENSAIOS DE SECREÇÃO ESTÁ ACIMA DE 97%.	54
6.2 O SECRETOMA DAS DUAS DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> CONTEM PROTEÍNAS SECRETADAS PRINCIPALMENTE POR VIAS ALTERNATIVAS ENVOLVENDO EXOSSOMOS	56
6.3 AS PROTEÍNAS SECRETADAS POR <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> ESTÃO ENVOLVIDAS PRINCIPALMENTE EM ATIVIDADES CATALÍTICAS	68
6.4 <i>MOONLIGHTING PROTEINS</i> : PROTEÍNAS SECRETADAS POR <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> PODEM TER MÚLTIPLAS FUNÇÕES DIFERENTES NO ESPAÇO INTRACELULAR E EXTRACELULAR	75
6.5 CEPAS DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> ASSOCIADAS A DISTINTAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS APRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS NA ABUNDÂNCIA DE PROTEÍNAS SECRETADAS	80
6.6 REDE DE INTERAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE ABUNDANTES NO SECRETOMA DAS CEPAS DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i>	84

6.7 A EXPRESSÃO GÊNICA AO NÍVEL DE MRNA APRESENTA CORRELAÇÃO COM A ABUNDÂNCIA DE PROTEÍNAS APENAS PARA ALGUNS GENES	90
6.8 O PRÉ-TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS MURINOS COM SECREÇÃO DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> AUMENTA O NÚMERO DE CÉLULAS INFECTADAS E A CEPA DISSEMINADA APRESENTA UM MAIOR ÍNDICE DE INFECÇÃO DO QUE A CEPA CUTÂNEA.	91
6.9 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS SECRETADAS POR MACRÓFAGOS SUBMETIDOS À INFECÇÃO COM <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i>	94
7 DISCUSSÃO	98
8 CONCLUSÕES	114
9 PERSPECTIVAS.....	115
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
11 APÊNDICES E/OU ANEXOS.....	133
11.1 ANEXO 1. SEQUENCIAS DE PRIMERS USADOS NA REAL TIME QPCR.....	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp..	18
Figura 1.2. Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea.	22
Figura 1.3. Mecanismos de secreção de proteínas.	36
Figura 4.1. Esquema de marcação isotópica.	45
Figura 5.1. Percentagem de viabilidade celular das cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	55
Figura 5.2. Percentagem de promastigotas marcadas com PI no experimento de secreção.	56
Figura 5.3. Predição de via de secreção para as proteínas identificadas no secretoma de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	67
Figura 5.4. Distribuição da classificação ontológica das proteínas secretadas por cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	69
Figura 5.5. Classificação ontológica para as proteínas identificadas na secreção de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .	72
Figura 5.6. Normalização da intensidade dos sinais para quantificação por iTRAQ.	81
Figura 5.7. Abundância relativa de peptídeos usados para quantificação de proteínas.	83
Figura 5.8. Networks para proteínas diferencialmente secretadas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	87
Figura 5.9. Níveis de expressão de genes cuja abundância foi diferencial no secretoma de cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	91
Figura 5.10. Imagem representativa de macrófagos infectados com promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	92
Figura 5.11. Efeito do pré-tratamento com secreção sobre a infecção <i>in vitro</i> de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	93
Figura 5.12. Quantificação de citocinas secretadas por macrófagos murinos pré-estimulados com secreção da cepa disseminada ou da cepa cutânea.	96
Figura 5.13. Quantificação de citocinas secretadas por macrófagos murinos infectados com a cepa disseminada ou cutânea de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Principais espécies de <i>Leishmania</i> que afetam humanos.....	20
Tabela 4.1. Descrição dos isolados de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> provenientes de pacientes com distintas apresentações clínicas da LTA.....	43
Tabela 5.1. Proteínas identificadas na secreção de <i>L. (V.) braziliensis</i>	58
Tabela 5.2. Predição de domínios funcionais para as proteínas não caracterizadas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	68
Tabela 5.3. Proteínas identificadas na secreção de <i>L. (V.) braziliensis</i> e classificadas em processos relevantes na interação parasito-hospedeiro.	73
Tabela 5.4. Proteínas identificadas no secretoma de <i>L. (V.) braziliensis</i> que apresentam funções múltiplas.	77
Tabela 5.5. Proteínas diferencialmente abundantes no secretoma da cepa de <i>L. (V.) braziliensis</i> associada à forma disseminada da doença em comparação com a cepa cutânea localizada.....	82
Tabela 5.6. Resumo de interações entre as proteínas diferencialmente abundantes.	89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Arg-1	Arginase-1
BSA	Bovine serum albumin (Albumina do Soro bovino)
CBA	Cytometric beads array
CD	Células dendríticas
Ct	Threshold cycle
DDA	Data dependent acquisition
DLD	Dehidrogenasse dihidrolipoyl
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEF1A1	Fator de alongação-1 α
ETD	Electron-transfer dissociation
FDR	<i>False discovery rate</i> (Taxa de identificações falsas)
GOEx	Gene Ontology Explorer
GRP78	Glucose-regulated protein 78
HCD	<i>Higher Energy Collisional Dissociation</i> (Colisão em alta energia)
HEPES	Ácido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansulfonico
HSP	Heat-shock protein
HSP70	Heat-shock protein 70
IAA	Iodoacetamida
IFN	Interferon
IIS	Integrated Interactome System
iNOS	Oxido nítrico sintase induzível
iTRAQ	Isobaric tags for relative and absolute quantitation
JACK/STAT	Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription
K	Lisina
KCl	Cloreto de potássio
LACK	Receptor da proteína cinase C ativada
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Disseminada
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LEP	Lisil-endopeptidase
LIP2	60S acidic ribosomal protein P2
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LRV1	<i>Leishmania</i> RNA vírus
LTA	leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose Visceral
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
NDK	Nucleoside diphosphate kinase
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de propídio
POP	Prolyl oligopeptidase
PSM	Peptide-Spectrum Match

PTP	Protein tyrosine phosphatase
PTP1B	Protein tyrosine phosphatase 1B
RE	Reticulo endoplasmático
RNAi	RNA de interferência
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPS3	40S ribosomal protein S3
SEPro	Search Engine Processor
SFB	Soro fetal bovino
SHP-1	Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase-1
SO	Ânion superóxido
TAT	Tyrosine aminotransferase
TCA	Ácido tricloroacético
TCEP	tris(2-carboxyetil)fosfina
TCP1	T-complex protein 1
TCPTP	Protein tyrosine phosphatase T cell Phosphatase
TEAB	Bicarbonato de trietilamônia
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TLR3	Toll-like Receptor 3
TNF	Fator de necrose tumoral
TOF	Tempo de voo

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* spp.

Os protozoários parasitos do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) são eucariotos da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, à qual também pertencem parasitos do gênero *Trypanosoma* (*Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*) e parasitas monoxênicos como *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Angomonas*, *Strigomonas* e *Blastocrithidia*. O gênero *Leishmania* agrupa cerca de 30 espécies diferentes, das quais pelo menos 20 são patogênicas para humanos. Embora a classificação de algumas espécies ainda seja controversa (1, 2), a divisão do gênero em dois subgêneros, *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*), proposta por Lainson e Shaw em 1987 (3), com base no desenvolvimento do parasito no inseto vetor, é amplamente aceita e tem sido corroborada por posteriores estudos moleculares. O gênero também inclui o subgênero *Sauroleishmania*, que agrupa espécies não patogênicas para humanos (4). As espécies do subgênero *L.* (*Leishmania*) são encontradas no Velho e Novo Mundo ao passo que as espécies do subgênero *L.* (*Viannia*) são encontradas exclusivamente no Novo Mundo. Os parasitos do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos da leishmaniose, termo que abrange um conjunto de doenças que podem se apresentar sob um espectro de formas clínicas: assintomáticas, lesões cutâneas simples, lesões disseminadas, com comprometimento da mucosa orofaríngea, até a visceralização que resulta fatal, caso não seja tratada. Estas formas clínicas dependem da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, da resposta imune e do “*background*” genético do hospedeiro (5, 6).

1.2 Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

O ciclo de vida de *Leishmania* é digenético, desenvolvendo-se em hospedeiros vertebrados e insetos vetores sob duas formas; uma denominada amastigota que é a forma intracelular não móvel, sem flagelo aparente e outra extracelular flagelada chamada promastigota, respectivamente. Os insetos vetores transmitem ao hospedeiro mamífero as formas extracelulares infectivas chamadas promastigotas metacíclicas, as quais são fagocitadas por células mononucleares do

hospedeiro migratórias e residentes tais como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e queratinocitos. Contudo, a fagocitose é “dirigida”, pois os parasitos são captados principalmente através do receptor da molécula do complemento C3b. Outros receptores reportados como mediadores da internalização de *Leishmania* são o receptor primeiro de complemento (CR1), o receptor de manose (MR), os receptores gamma Fc (FcγRs) e os receptores de fibronectina (FnRs) (7-12). Dentro dessas células, a *Leishmania* tem a capacidade de evadir o poder microbicida do fagolisossoma, formado pela fusão do fagossomo com os lisossomos (13, 14). Nos fagolisossomos, os promastigotas se diferenciam na forma intracelular amastigota, que posteriormente se multiplica, aumentando consideravelmente a carga parasitária e induzindo à morte celular. As amastigotas são liberadas no espaço extracelular onde macrófagos vizinhos não infectados fagocitam as amastigotas livres, fazendo com que a infecção se propague, aumentando o número de células infectadas e favorecendo a patologia associada à forte resposta inflamatória e consequente dano tecidual (15). O ciclo de vida do parasito continua quando insetos vetores não infectados sugam o sangue contendo macrófagos infectados e/ou amastigotas. Já dentro do intestino do inseto, o parasito sofre novamente a transformação para a forma extracelular multiplicativa, chamada promastigota procíclica, a qual sofre posteriores transformações até chegar à forma infectiva metacíclica não replicativa que é transmitida para um novo hospedeiro, dando continuidade assim ao ciclo (Figura 1.1) (13, 16). A metaciclogênese é o processo de desenvolvimento que experimentam os parasitos naturalmente no trato digestivo do inseto vetor e que compreende a transformação de promastigotas procíclicas para promastigotas metacíclicas altamente infectivas. Este processo é complexo e envolve mudanças na expressão gênica, moléculas de superfície e na morfologia (17). Em geral, as formas procíclicas exibem corpo grande e flagelo curto, enquanto as formas infectivas metacíclicas exibem corpo curto e flagelo comprido, que normalmente chega a ser duas vezes o comprimento do corpo (18).

Dependendo da espécie infectante, durante o processo de invasão e multiplicação, existe a possibilidade de migração dos parasitos das células infectadas para outras partes do corpo, distantes do sítio de infecção inicial, o que é conhecido como metástase, levando ao desenvolvimento de lesões em novas regiões do corpo e complicando ainda mais o controle da infecção por parte do hospedeiro (19).

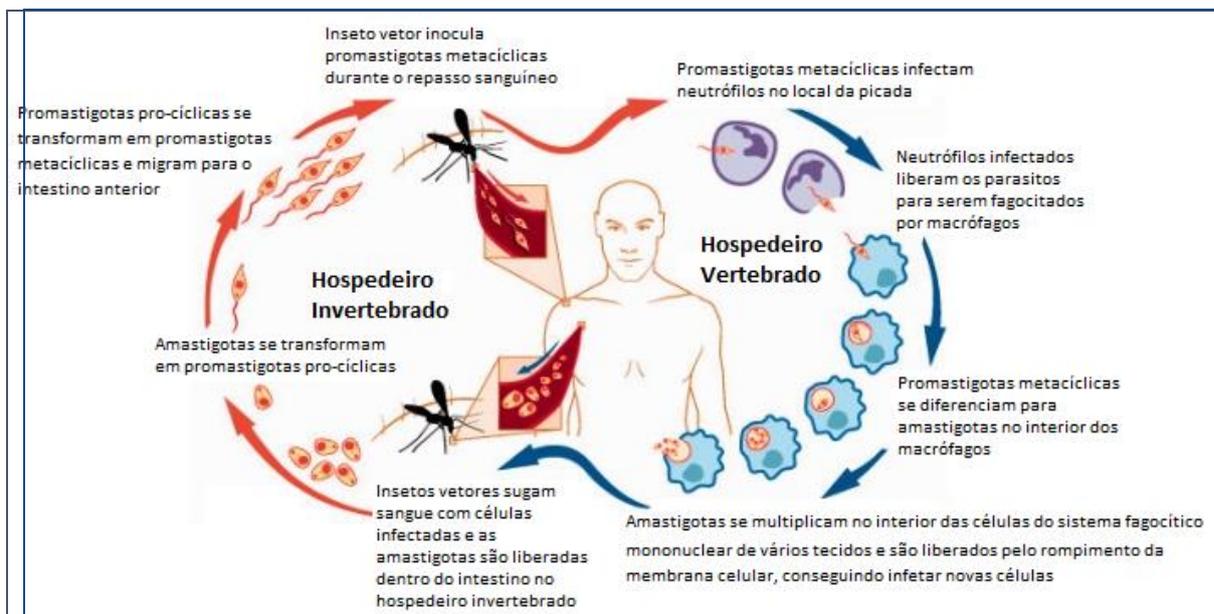


Figura 1.1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Adaptado de National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID), <http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/pages/lifecycle.aspx> (15 dezembro 2015).

Durante a invasão, o parasito utiliza o flagelo para a mobilidade e interação inicial com as células do hospedeiro; este processo envolve também a liberação de moléculas necessárias para as primeiras etapas de infecção (20, 21). O flagelo no hospedeiro invertebrado tem sido descrito como o facilitador de motilidade e fixador do parasito dentro do intestino dos flebotomíneos, sendo importante para transmissão do parasito via insetos vetores (21). No caso do hospedeiro vertebrado, tem sido observado que macrófagos não fagocitam promastigotas com motilidade inibida, indicando que o flagelo desenvolve um papel importante no processo inicial de infecção em macrófagos (20).

Estudos sobre a interação entre neutrófilos e *L. (L.) major* têm revelado importantes aspectos sobre o papel destas células nas primeiras etapas de infecção (22). Foi observado que promastigotas de *Leishmania* são rapidamente fagocitados por neutrófilos e que os parasitos são capazes de sobreviver dentro destas células (23). Também foi descrito que os neutrófilos infectados apresentam um fenótipo apoptótico que induz (i) o recrutamento de macrófagos para o local da infecção e (ii) sua fagocitose por parte desses macrófagos (22, 24). Assim, estes estudos propuseram que os neutrófilos serviriam como “cavalos de Troia” que podem favorecer a sobrevivência das promastigotas nas primeiras etapas de infecção e sua entrada “silenciosa”, sem ativação do arsenal microbicida, do macrófago (24). De fato, devido à rápida infiltração de neutrófilos no local da picada, estas células seriam as primeiras a serem infectadas pelo parasito; logo depois, estes neutrófilos

infectados ou parasitos livres são fagocitados por macrófagos e/ou células dendríticas, que podem migrar para outros locais, iniciando o perigoso caminho para a disseminação (24-26).

1.3 Bioquímica da diferenciação

O processo de diferenciação da forma promastigota para amastigota descrito anteriormente é provocado, principalmente, pelo aumento da temperatura e diminuição do pH que o parasito experimenta no fagolissossomo. Este processo é acompanhado por mudanças metabólicas, principalmente, na fonte de energia usada pelos parasitos para sua proliferação e desenvolvimento. Em amastigotas observa-se uma diminuição no uso de glicose e aminoácidos como fonte de energia e um aumento no consumo de outras hexoses e ácidos graxos para produzir os substratos necessários para a produção de glutamato, essencial para a sobrevivência da amastigota (20). Além das mudanças nos fatores externos, como temperatura e pH, foi demonstrado que elementos, tais como o ferro, têm um papel na diferenciação dos parasitos. Contudo, o ferro em sua forma solúvel íon Fe(II) pode reagir com oxigênio ou nitrogênio para formar espécies reativas de oxigênio (ROS) ou de nitrogênio (RNS), através da reação de Fenton, que resultam tóxicas para o parasito (27). No entanto, a formação de ROS (particularmente, peróxido de hidrogênio), pela captação de ferro, favorece a diferenciação do parasito, indicando que um delicado equilíbrio entre produção e desintoxicação de radicais livres é necessário para o processo de diferenciação (27, 28). O ferro é então fundamental tanto para a diferenciação e replicação intracelular do parasito, como para a resposta do hospedeiro (27). Nas células do hospedeiro, em particular nos macrófagos, o ferro está envolvido na polarização da resposta imune: em doenças crônicas e auto-imunes, caracterizadas pela produção de citocinas que desencadeiam um aumento da população de macrófagos com perfil pró-inflamatório, estes acumulam ferro, levando à manutenção do perfil pró-inflamatório. Por outro lado, macrófagos ativados pela via alternativa liberam altas quantidades de ferro, exacerbando a doença autoimune e contribuindo na fibrose (29, 30).

1.4 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico. Contudo, no Velho Mundo, na Índia, é reconhecido um ciclo antroponótico no qual o reservatório principal do parasito é o ser humano. A transmissão natural da doença ocorre pela picada de flebotomíneos fêmeas do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (31). No ciclo zoonótico, varios animais são reservatórios naturais do parasito, incluindo cães domésticos e selvagens, preguiças, porcos, roedores como ratos e camundongos, entre outros (19).

Como mencionado anteriormente, a leishmaniose é um termo que abrange uma variedade de formas clínicas, dentre as quais, as três entidades mais prevalentes em humanos são a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucocutânea (LMC) e a leishmaniose visceral (LV). A forma da doença é determinada pela espécie do parasito envolvida na infecção e pela susceptibilidade do hospedeiro, associada com sua resposta imune (19). A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada e está associada muitas vezes a situações de pobreza, desnutrição, mudanças ambientais e climáticas e conflito armado com consequente deslocamento de populações susceptíveis (32, 33). As principais espécies que afetam humanos tanto no Velho Mundo como no Novo Mundo, bem como a forma clínica da doença, são apresentadas na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Principais espécies de *Leishmania* que afetam humanos. Adaptado de Kaye & Scott, 2011 (34).

Principal manifestação da doença	Espécies no Novo Mundo	Espécies no Velho Mundo
Leishmaniose Cutânea	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. peruviana</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. mexicana</i> , e <i>L. pifanoi</i> .	<i>L. major</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. aethiopica</i>
Leishmaniose Mucocutânea	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamensis</i> , e <i>L. guyanensis</i>	
Leishmaniose Visceral	<i>L. infantum</i>	<i>L. donovani</i> e <i>L. infantum</i>

1.4.1 Leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada por lesões nodulares ou ulceradas únicas ou múltiplas na pele, geralmente localizadas no local da picada do inseto, sendo as partes descobertas do corpo, como rosto, perna e braços, as mais afetadas (19, 35). A LC pode ser causada por agentes do subgênero *L. (Viannia)* e *L. (Leishmania)*. No continente americano, a LC é também conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA). A LTA é endêmica em diferentes países das Américas do Norte, Central e do Sul e é causada principalmente pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* (33, 35-37). Algumas das características da LTA causada por estes parasitos, em particular por *L. (V.) braziliensis*, são a persistência do parasito e sua tendência a fazer metástase, caracterizada pelo surgimento de múltiplas lesões cutâneas (leishmaniose cutânea disseminada-LCD), e/ou lesões na mucosa orofaríngea (leishmaniose mucocutânea-LMC), após o aparecimento da lesão única simples inicial. Estas formas se apresentam como consequência da disseminação do parasito por via sanguínea ou linfática, o que faz destes parasitos alvos interessantes para o estudo do processo de disseminação e invasão (38-40).

A incidência da LC no mundo é alta; entre ~700.000 a 1.200.000 casos são reportados anualmente, sendo que 75% destes ocorrem em apenas 10 países, incluindo o Brasil (6). A distribuição da LC no mundo é apresentada na Figura 1.2. Nas Américas, a incidência anual de casos é estimada entre 180.000 a 300.000 (6). Estima-se que no período de 2003 a 2007, a média da incidência anual de LC no Brasil foi de ~27.000 casos, sendo reportados em 23 estados da União (6). Na América do Sul, a LC é causada principalmente por *L.(V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, e *L.(V.) guyanensis*, e a infecção com estas espécies está associada com a progressão da doença para formas mais graves como a LMC ou LCD. Contudo, pouco se entende sobre os mecanismos moleculares e patológicos envolvidos no processo de disseminação do parasito que, no caso da LMC, podem levar ao comprometimento da mucosa e que finalmente resultam numa resposta destrutiva do tecido (41, 42).

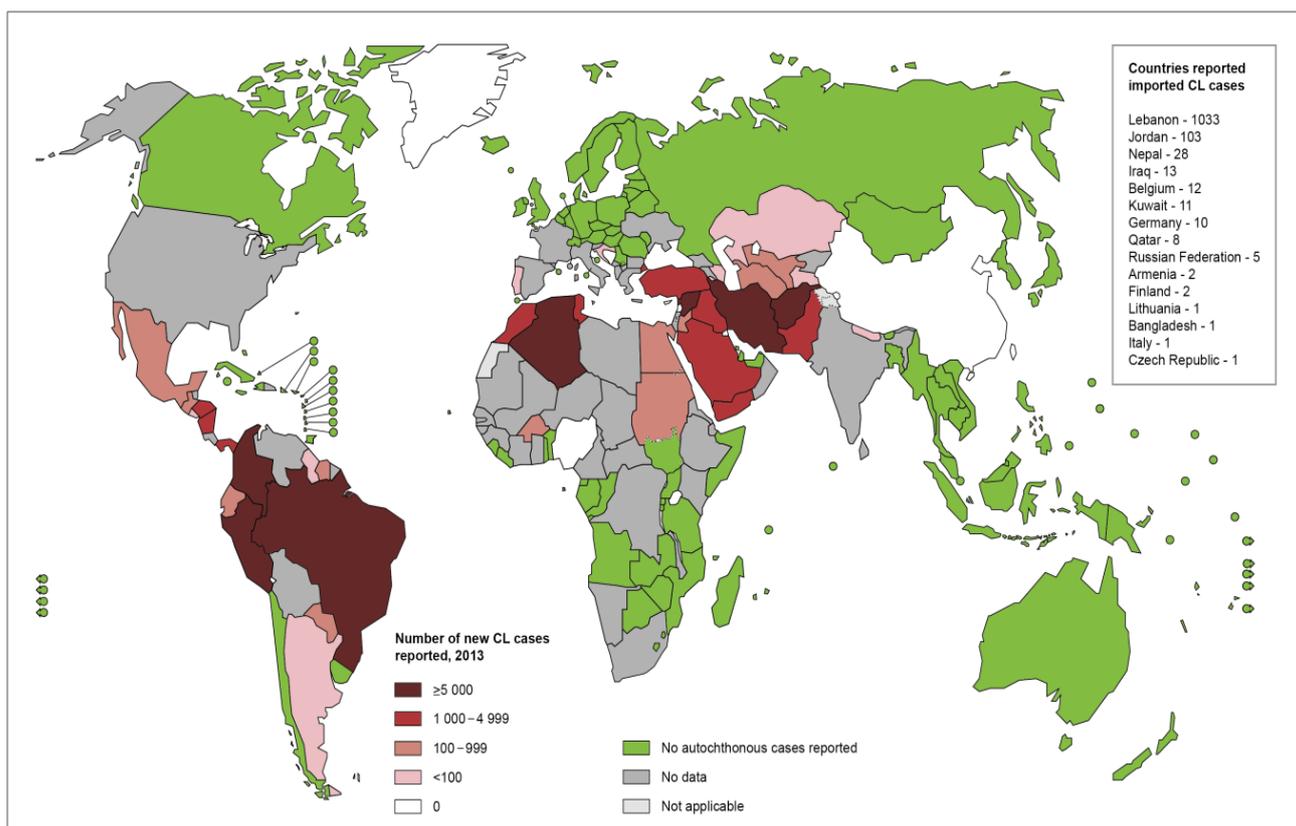


Figura 1.2. Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea. World Health Organization (WHO) http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_CL.png (26 de Outubro de 2015)

1.4.2 Leishmaniose mucocutânea

A LMC é uma forma complicada da LTA que está associada principalmente a infecções com *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* e, em menor medida, com *L. (L.) amazonensis*. A LMC envolve a disseminação do parasito desde o sitio da lesão cutânea primária até a mucosa orofaríngea, excluindo lesões contíguas (na face ou pescoço, por exemplo) e acomete ~5-10% dos pacientes que apresentam LC (41, 42). Contudo, alguns autores têm reportado o aparecimento de lesões mucosas sem relato de lesão cutânea primária, razão pela qual tem sido proposta uma forma denominada leishmaniose mucosa (37, 43).

A distribuição geográfica da LMC inclui Brasil, Peru e Bolívia, mas também é possível encontrar casos na Colômbia, Equador, Paraguai e Venezuela (19). A LMC normalmente não apresenta uma apropriada resposta ao tratamento de primeira linha, com antimoniais, e pode complicar-se ainda mais por infecções secundárias produzidas por outros microrganismos na área da lesão (41, 42). O acometimento da mucosa orofaríngea pode acontecer meses ou anos depois da resolução da lesão

primária cutânea e é caracterizada pela desfiguração dos tecidos mucosos do nariz, da boca e/ou da oro-faringe, podendo progredir até afetar a respiração e nutrição (19). A patogênese da LMC é pouco entendida, mas é aceito que a resposta inflamatória descontrolada observada em alguns pacientes tem um papel fundamental no desenvolvimento da lesão e que essa resposta é provavelmente devida a fatores complexos que envolvem interações entre o parasito e o hospedeiro (19, 44). Em estudo anterior do nosso grupo, com o intuito de identificar potenciais marcadores de disseminação nos parasitos, distintos marcadores genéticos foram analisados em cepas pareadas de lesão cutânea e mucosa de um mesmo paciente, mas não houve um marcador que pudesse ser claramente associado a cada forma da doença (45). Estudos com clones metastáticos e não metastáticos de *L. (V.) guyanensis* têm sugerido que o fenótipo metastático poderia estar associado à presença de um vírus, denominado *Leishmania* RNA vírus (LRV1), o qual induziria respostas pró-inflamatórias mediadas por receptor do tipo Toll (*Toll-like Receptor 3* - TLR3) e contribuiria com a severidade da doença (44, 46). O LRV1 pertence à família Totiviridae e foi descrito inicialmente em 1988 por Tarr et al. (47). Ele tem sido reportado em espécies do subgênero *L. (Viannia)*, particularmente em *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, as duas responsáveis por casos de LTA (46, 48). Embora outras espécies associadas à LMC também tenham sido encontradas infectadas com o *Leishmania* RNA vírus (49) nem todas as cepas e/ou espécies que causam LMC portam o LRV1 (50) indicando que outros fatores, além do vírus, estariam envolvidos no desenvolvimento desta forma clínica. Também tem sido sugerido que a expressão de certas isoformas de peroxirredoxina em clones metastáticos de *L. (V.) guyanensis*, poderia contribuir para a sua persistência na célula hospedeira e esta persistência seria um pré-requisito para a doença metastática (51).

Com respeito aos fatores do hospedeiro envolvidos no desenvolvimento da LMC, tem sido observado que células T CD8⁺ citotóxicas estariam associadas com a metástase de *L. (V.) braziliensis*, devido à sua ativa desgranulação e posterior lise das células infectadas com o parasito. Contudo, esta resposta citolítica não seria protetora; pelo contrário, promoveria o recrutamento de neutrófilos ao sítio da infecção e o desenvolvimento de lesões metastáticas em locais distantes da lesão inicial (52). Além do papel das células T CD8⁺ no incremento da patologia e sua possível relação com lesões metastáticas na LTA, outras células do sistema imune do hospedeiro têm um papel relevante nas primeiras etapas de infecção,

favorecendo ou não o estabelecimento da infecção e desenvolvimento da doença. De fato, têm sido observado um acúmulo de células T regulatórias (Treg, Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺), produtoras de IL-10 e TGF- β em lesões de pacientes com LC (53), as quais desempenham um papel na regulação de respostas imunes e contribuiriam para tolerância imunológica. Contudo, há o consenso que a diminuição da carga parasitária e o controle da infecção está associado à produção de TNF- α e superóxido (54, 55).

1.4.3 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é outra forma grave da doença que apresenta a disseminação do parasito. A LV é considerada como zoonótica na região do Mediterrâneo e no continente Americano e antroponótica na Ásia e na África, incluindo alguns países como Índia e Nepal (26, 56, 57). A forma visceral é a entidade clínica mais severa da leishmaniose, causando a morte em 85-90% dos pacientes sem tratamento, e pode ser entendida como o caso mais grave de disseminação, onde células hospedeiras infectadas com o parasito são disseminadas geralmente desde o local da lesão cutânea inicial para outros órgãos como baço, fígado e medula óssea (19, 26, 56, 57). No Novo Mundo, a espécie responsável pela manifestação visceral da doença é *L. (L.) infantum*, sendo que a maioria dos casos ocorre no Brasil: perto de 95% dos casos de LV reportados nas Américas no período de 2003-2007 ocorreram no país (6). No Velho Mundo a incidência da LV é ainda maior, sendo causada principalmente por *L. (L.) donovani* na região da Índia, Paquistão, China e África, e por *L. (L.) infantum*, na região Mediterrânea (57). Os sintomas geralmente incluem hepatoesplenomegalia, febre alta, pancitopenia e hipergamaglobulinemia e a doença pode ser fatal se não for tratada (26, 58). Embora estudos imunológicos, genômicos e em modelos animais tenham fornecido informação importante sobre o processo de visceralização, ainda pouco se entende sobre os determinantes do fenômeno de disseminação do parasito que levam à LV (26).

1.5 Interação parasito-hospedeiro

Dentre as células fagocíticas que pertencem ao sistema imune inato, os macrófagos têm como papel principal fagocitar corpos estranhos, eliminar células

apoptóticas e reciclar nutrientes de tecidos residuais (59). Contudo, no caso de infecções com *Leishmania*, os macrófagos são o alvo principal do parasito, pois é dentro deles que este parasito se transforma, multiplica e estabelece a infecção. O complexo balanço que existe entre o parasito e a célula hospedeira pode ser favorecido para algumas das partes de acordo com os diferentes mecanismos que o parasito tem para subverter a resposta imune e causar doença, ou que o macrófago ativa para controlar a infecção. A sutileza deste equilíbrio é exemplificada pelas infecções com *L. (V.) braziliensis*, nas quais cepas diferentes da mesma espécie causam formas clínicas desde relativamente simples como lesões cutâneas autorresolutivas até mais complexas como lesões sérias ulceradas no tecido mucoso oro-faríngeo (20). A resposta imune inata contra o parasito, nos momentos iniciais da infecção, é mediada por células fagocíticas mononucleares e polimorfonucleares, por moléculas do complemento e envolve a produção de citocinas e quimiocinas (34). A fagocitose ocorre através de opsonização pela C3b. Esta molécula do complemento é clivada pela metalopeptidase GP63 do parasito, convertendo-a em C3bi, a qual favorece a internalização, sem proteólise, do parasito (11). A fagocitose ativa o macrófago para a produção de fatores citostáticos e citolíticos que controlam a proliferação do parasito. Apesar dos mecanismos de defesa das células fagocíticas, durante a etapa de infecção e multiplicação, *Leishmania* consegue subverter o ambiente microbicida do macrófago e se estabelecer no ambiente intracelular. A ativação dos macrófagos frente a um estímulo pode se dar pela via clássica ou pela via alternativa (60-62). Na ativação pela via clássica, os macrófagos produzem citocinas inflamatórias tais como TNF- α , IL-12, IL-1 β e IL-6, as quais culminam na indução do gene da óxido nítrico sintase (iNOS) que usa L-arginina para produção de óxido nítrico (NO) cujo poder microbicida controla a proliferação do parasito (34, 63-65). Por outro lado, a ativação do macrófago via estimulação com citocinas tipo 2, tais como IL-4, IL-10 ou IL-13 é denominada via alternativa e induz à produção de IL-10 e IL-1RA, bem como a expressão do gene que codifica para arginase-1 (Arg-1). Arg-1 metaboliza a L-arginina à ureia e L-ornitina, produzindo poliaminas e prolina, e desta forma compete com a iNOS pela arginina e, portanto, suprime a produção de NO necessário para o controle do parasito (66). Os macrófagos ativados pela via alternativa estão envolvidos em imunossupressão e reparo do tecido. As poliaminas estão envolvidas no crescimento celular e divisão, enquanto que a prolina é um componente chave do colágeno (67). A inibição da atividade dos macrófagos nos primeiros momentos da infecção e/ou a ativação pela

via alternativa é modulada por uma série de fatores de virulência liberados pelo parasito (68, 69) e poderia determinar o curso da infecção.

No caso da ativação pela via clássica, a produção de citocinas pró-inflamatórias também induz o recrutamento de células ao local da infecção, onde células apresentadoras de antígenos processam e apresentam as moléculas do parasito às células T *naive*, ativando a imunidade adaptativa e a resposta imune celular efetora que promove a resistência contra o parasito (70). O paradigma da susceptibilidade e resistência à *Leishmania* no modelo murino de infecção com *L. major* postula que cepas de camundongos resistentes à infecção, tais como C57BL/6, desenvolvem lesões menores e autorresolutivas como produto da expansão preferencial de células T CD4+ *helper* 1 (Th1), as quais estão associadas à produção de altos níveis de IFN- γ e IL-2 e baixos níveis de IL-10 e IL-4 (70, 71). Altos níveis de IFN- γ ativam macrófagos para a produção final de NO que controla a proliferação do parasito. Por outro lado, a susceptibilidade à infecção observada em camundongos BALB/c é caracterizada pela expansão de células Th2 com produção de IL-4, IL-5 e IL-13, as quais suprimem a ativação dos macrófagos e, portanto, dos mecanismos microbicidas, favorecendo a multiplicação dos parasitos e o desenvolvimento da doença (70-72). Contudo, é importante destacar que este paradigma não se aplica a todas as espécies de *Leishmania*, e que em particular esta polarização da resposta não é tão evidente em infecções com *L. (V.) braziliensis* (5, 73-75). Embora a produção de citocinas Th1 ou Th2 e seu (des) equilíbrio dependam da espécie infectante e do modelo estudado, há um consenso geral que indica que a presença de IFN- γ e TNF- α são necessários para o controle da proliferação do parasito (70, 76-78).

1.6 *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Leishmania (V.) braziliensis é uma das principais espécies responsáveis pela LTA no continente Americano e apresenta importantes particularidades com respeito às outras espécies que também causam LTA. Esta espécie agrupa um complexo conjunto de subpopulações do parasito com características epidemiológicas, bioquímicas e imunológicas diferentes. De fato, diferentes cepas desta espécie estão associadas a diferentes formas clínicas da doença tegumentar. Os casos de leishmaniose causados por *L. (V.) braziliensis* em suas duas manifestações clínicas

principais, LC localizada e LMC, ocorrem em regiões mais extensas, geograficamente, quando comparado com outras espécies como *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* ou *L. (L.) amazonensis*, também responsáveis por casos da LTA (36, 79-82). Além das diferenças encontradas na distribuição geográfica e nas diferentes formas clínicas da LTA causadas por esta espécie na América do Sul, o nível de heterogeneidade biológica e fenotípica deste parasito nas áreas endêmicas é de interesse para o entendimento da relação parasito-hospedeiro e o desenvolvimento das distintas manifestações clínicas.

Leishmania (V.) braziliensis é transmitida por varias espécies de vetores flebotomíneos e tem sido isolada de um grande número de animais potencialmente reservatórios (79). Os principais hospedeiros vertebrados silvestres de *L. (V.) braziliensis* ainda não foram identificados, mas é sabido que cães e eqüinos fazem parte do ciclo doméstico e peridoméstico de transmissão do parasito (79). Lesões cutâneas simples autorresolutivas, lesões mucocutâneas e lesões cutâneas disseminadas fazem parte do pleiomorfismo clínico ao qual esta espécie tem sido associada, sendo proposto que seu polimorfismo genético poderia estar relacionado com a diversidade de manifestações clínicas (77, 79, 83-88).

Em infecções experimentais com *L. (V.) braziliensis*, lesões autorresolutivas atingem seu pico após 4-6 semanas da infecção, desaparecendo posteriormente sem tratamento (77). Como mencionado antes, no modelo murino de resistência à infecção com *L. (L.) major*, a resolução da doença resulta de uma série de eventos, incluindo: (i) uma eficiente ativação de células dendríticas (CD), (ii) produção de citocinas, tais como IL-12, IL-18, e IL-27, que induzem à diferenciação de células (CD4+Th1), (iii) ativação de células Th1 produtoras de IFN- γ e TNF- α e (iv) ativação de macrófagos pela via clássica para a produção de radicais de óxido nítrico que resultam no controle da proliferação e eliminação do parasito, levando à resolução da lesão (77, 78).

Já no modelo macaco de infecção autorresolutiva por *L. (V.) braziliensis*, foi observado que, na fase aguda, células inflamatórias, como mastócitos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos, são recrutadas ao sítio da infecção e que macrófagos fagocitam e destroem neutrófilos apoptóticos infectados. Na fase crônica, os parasitas que ainda persistem induzem uma reação granulomatosa mediada por citocinas Th1, com recrutamento de células T produtoras de IFN- γ e TNF- α . A seguir, a resolução foi associada com o concomitante recrutamento de células T

regulatórias (Treg) produtoras de IL-10 que suprimem essa resposta inflamatória (89, 90).

Por outro lado, além da LC localizada e da disseminação metastática do parasito para a mucosa orofaríngea, caracterizada pela forte resposta imune celular Th1 e severa resposta inflamatória, *L. (V.) braziliensis* também pode disseminar para locais distantes da lesão inicial, provocando múltiplas lesões na pele, em ~3% dos casos. Esta forma da doença tem sido denominada leishmaniose cutânea disseminada (LCD) e apresenta características particulares (36, 83, 91).

Os casos de LCD têm sido majoritariamente reportados no Brasil, na região de Corte de Pedra, onde todas as formas da LTA são normalmente encontradas (83), mas também têm sido reportados em outras regiões do continente (92-94) . A LCD caracteriza-se por numerosas lesões acneiformes, papulares, nodulares e/ou ulceradas distribuídas em diferentes partes do corpo (87). Desta forma, tanto a LMC como a LCD são consideradas formas metastáticas da infecção causada por *L. (V.) braziliensis* (83). Ao passo que citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ estão associadas à resolução da lesão no caso da LC localizada e à destruição do tecido mucoso no caso da LMC, níveis diminuídos destas mesmas citocinas parecem estar associados com a LCD, indicando uma débil resposta mediada por células T que leva à falha no controle do parasito, mas, ao mesmo tempo, favorece a pouca destruição do tecido (contrário ao observado na LC localizada e LMC) (88). Interessantemente, foi observada uma diminuição nas células T CD4+ e aumento de Treg no sangue periférico de pacientes com LCD (95), acompanhado com a baixa produção de citocinas tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-5), o que contribuiria para a disseminação do parasito (93).

Embora outras espécies do subgênero *L. (Viannia)* possam disseminar metastaticamente, *L.(V.) braziliensis* é, notavelmente, a causa mais frequente das formas disseminadas da doença (LMC e LCD). Contudo, o processo de progressão da lesão cutânea para LMC ou LCD ainda não é bem compreendido (48). Como mencionado antes, dentre as variáveis que poderiam contribuir com o desenvolvimento destas formas clínicas tem sido descrita a presença do LRV1, o qual poderia ser responsável pelo aumento da carga parasitaria, pela reação destrutiva aumentada do tecido e pela exacerbação geral da doença (44, 48). Tem sido descrito que mais de 25% de cepas de *L. (V.) braziliensis* portam o LVR1 e sua presença estaria associada significativamente com um maior risco de falha ao tratamento com antimonial em pacientes do Perú e da Bolívia (48). Não obstante, a

presença do LVR1 não teve relação com a resistência intrínseca dos parasitos ao medicamento, nem com a sua capacidade metastática, indicando que a falha ao tratamento é mediada por efeitos do LRV1 sobre o metabolismo do hospedeiro e/ou sobre a carga parasitária (48). Assim, os fatores do parasito envolvidos na disseminação metastática ainda não são bem entendidos.

As duas cepas de *L. (V.) braziliensis* utilizadas nesta tese correspondem a uma isolada de um paciente com lesão cutânea localizada e a outra isolada de um paciente com múltiplas lesões disseminadas. Embora pertençam à mesma espécie, provenham da mesma região geográfica e pertençam ao mesmo zimodema, estas cepas causaram manifestações clínicas muito polares e esse fenótipo clínico foi reproduzido no modelo macaco (89, 96). No caso da cepa 13396 (MHOM/BR/2000/LTCP-13396), isolada de paciente com múltiplas lesões cutâneas disseminadas, quando inoculada em macacos rhesus induziu a disseminação em todos os casos (96); por sua vez a cepa cutânea 13490 (MHOM/BR/2000/LTCP-13490) isolada de paciente com lesão cutânea simples, apresentou lesão autorresolutiva em 100 % dos casos no modelo macaco, reproduzindo o observado no paciente humano (89), indicando que características intrínsecas do parasito estariam envolvidas na produção das diferentes formas clínicas. Estas cepas também foram previamente caracterizadas quando ao seu perfil de metalopeptidases, apresentando perfis proteolíticos idênticos tanto no extrato total quanto na secreção (86). A caracterização aprofundada destas cepas associadas à LC autorresolutiva (13490) e à LCD (13396) as qualifica como um excelente modelo para entender o problema da disseminação do parasito.

Além disso, a caracterização de cepas associadas a diferentes manifestações clínicas pode permitir a identificação de potenciais alvos para o diagnóstico e/ou o prognóstico da doença, visando um tratamento oportuno. Estudos recentes de expressão gênica e perfis de infecção de amostras clínicas de pacientes com LC e LMC, mostraram que a proteína LbrPGF2S (*prostaglandin f2-alpha synthase*) está aumentada nas cepas LC e que a sobre-expressão desta proteína aumenta a virulência dos parasitos *in vitro* (97), reforçando a hipótese de que características intrínsecas do parasito contribuiriam ao desenvolvimento de formas clínicas diferentes.

1.6.1 Genômica, transcriptômica e proteômica de *L. (V.) braziliensis*

O sequenciamento do genoma de varias espécies de *Leishmania* acelerou consideravelmente os estudos de genômica funcional nestes parasitos e pavimentou o caminho para o entendimento de fenômenos de regulação gênica particulares deste gênero (98-101). Atualmente há disponíveis genomas de 13 espécies de *Leishmania* na base de dados de tripanossomatídeos “Trytrip” (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>), incluindo os genomas de duas cepas de referência de *L. (V.) braziliensis*. Em geral, o genoma de *Leishmania* spp. é caracterizado por uma quase completa ausência de íntrons, sendo que a maior parte do genoma é expresso constitutivamente durante o ciclo de vida do parasito (102). Entretanto, é importante notar que mais de 50% dos genes destes parasitos não tem uma função conhecida.

Apesar da variabilidade importante na patogenicidade e no tropismo das diferentes espécies de *Leishmania*, seus genomas são notavelmente semelhantes, exibindo um elevado grau de conservação gênica (103). Uma comparação entre o genoma de *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* mostrou que apenas 200 genes diferem entre estas espécies e que apenas 47 genes são específicos de *L. (V.) braziliensis* (99), o que não explicaria a extensão do polimorfismo clínico causado por estas espécies, mas representam o primeiro passo para entender a complexidade da interação parasito-hospedeiro (103). Além disso, interessantemente, entre os genes diferenciais foram identificados elementos transponíveis e genes da maquinária de RNA de interferência (RNAi) somente em *L. (V.) braziliensis* (99). Os componentes da maquinária de RNAi são funcionais (104), possibilitando ensaios de silenciamento gênico nesta espécie.

Um dos primeiros estudos de transcriptômica comparativa entre *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* revelou também uma expressão gênica conservada e um pequeno número de diferenças relacionadas à distribuição gênica ou à regulação diferencial de genes conservados ao nível traducional e/ou pós-traducional (105). Mais recentemente, a análise comparativa do transcriptoma de cinco isolados de *L.(V.) braziliensis* apresentando diversos fenótipos clínicos e diversos fenótipos *in vitro* mostrou que a dinâmica da expressão gênica é um caráter único de cada cepa, e sugere que análises de cepas individuais não seriam representativas da expressão na espécie (106).

O proteoma predito de *Leishmania* spp. apresenta ~8300 proteínas (107), ao passo que o proteoma experimental é altamente dinâmico e varia de acordo com (i) a forma do parasito (amastigota ou promastigota), (ii) as condições de cultivo, (iii) o *subset* do proteoma de estudo (fosfoproteoma, secretoma, por exemplo) e (iv) a técnica proteômica utilizada, entre outros. Proteomas experimentais de várias espécies de *Leishmania*, sob diversas condições, têm sido descritos, contribuindo para o conhecimento da expressão gênica ao nível de proteína nestes parasitos e, em muitos casos, comprovando a anotação hipotética de genes codificantes (108, 109). O primeiro mapa proteômico de *L. (V.) braziliensis* foi feito pelo nosso grupo em 2007, usando eletroforese em bidimensional (2DE) e análise por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight*) (110). Neste estudo, foram resolvidos ~800 *spots* proteicos no gel e identificadas 75 proteínas contendo diversas modificações pós-traducionais. Embora o desenvolvimento de melhores metodologias para fracionamento de proteínas e identificação por espectrometria de massas permita atualmente obter uma cobertura muito maior do proteoma predito, pouco se avançou a respeito da descrição dos proteomas de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo. De fato, foi reportado (i) o proteoma geral de *L. (V.) panamensis* (111); (ii) a análise proteômica da sua diferenciação (112) e de (iii) sua resistência ao antimonial (113, 114), em todos os casos por 2DE e com a identificação de uma dúzia de proteínas. Interessantemente, também foram conduzidas análises proteômicas de clones metastáticos e não metastáticos de *L. (V.) guyanensis* com o intuito de determinar fatores associados à disseminação do parasito (51, 115). Estes estudos indicaram que os clones metastáticos apresentam expressão diferencial de perixorredoxina, a qual modularia a resistência à resposta microbicida. Parasitos mais resistentes podem sobreviver e persistir no hospedeiro, o qual seria pré-requisito para a posterior metástase (51).

Em relação à análise de subproteomas, nosso grupo também descreveu o primeiro mapa do secretoma de *L. (V.) braziliensis*, sendo possível identificar 42 proteínas, incluindo vários fatores de virulência e de modulação da resposta imune do hospedeiro (116). O estudo do secretoma de *Leishmania* tem ganhado um amplo interesse por se tratar das moléculas que modulam a comunicação entre o parasito e as células hospedeiras desde os primeiros momentos da infecção. Assim, também têm sido reportados os secretomas de outras espécies, sendo identificadas 151 proteínas no secretoma de *L. (L.) donovani* (117), e 72 para *L. (L.) mexicana* (118). Estes números variam devido à técnica proteômica utilizada em cada experimento,

mas a relevância que tem a identificação de um número maior ou menor de proteínas não é comparável com importância da identificação da função que cada proteína observada na secreção pode ter e a consequente interpretação biológica dos dados. No entanto, a interpretação biológica continua sendo um desafio devido à pouca informação existente sobre a função da maioria das proteínas de *Leishmania*.

Também foi recentemente reportada uma análise fosfoproteômica de cepas de *L. (V.) braziliensis* com resistência induzida antimonial (119), na qual três proteínas foram apontadas como potencialmente envolvidas na resistência. A disponibilidade de uma variedade de genomas em conjunto com as análises de transcriptomas e proteomas das várias espécies de *Leishmania* sem dúvida poderá ajudar a entender os complexos mecanismos da interação parasito-hospedeiro que resultam nos diferentes cursos de infecção e manifestações clínicas polares da doença.

1.7 Proteômica

Avanços nas tecnologias de sequenciamento genômico e transcritoômico trazem também novas perspectivas na proteômica, especificamente no estudo das proteínas secretadas por diferentes microrganismos. O estudo do secretoma de *Leishmania* é essencial para desvendar os mecanismos moleculares fundamentais pelo qual o parasito consegue sobreviver e interagir com o hospedeiro para a invasão e proliferação dentro da célula hospedeira. A aplicação de tecnologias proteômicas no estudo das proteínas secretadas além de permitir a identificação das proteínas visa também à quantificação de proteínas que possam gerar alvos interessantes de estudo. Desta forma, nos últimos anos, houve uma grande preocupação com o desenvolvimento e estabelecimento de protocolos de marcação e quantificação que possam ser aplicados a uma vasta gama de amostras, dentre estas estratégias existe a denominada “*bottom-up*” que se baseia na hidrólise das proteínas em seus peptídeos e posterior análise desses peptídeos por espectrometria de massa (MS). Nesta abordagem, as misturas complexas de proteínas podem ser fracionadas por eletroforese uni (1-DE) ou bidimensional (2-DE) e neste caso aplica-se o termo “estratégia baseada em gel” (*gel-based*) ou podem ser fracionadas por outros métodos como, por exemplo, a cromatografia líquida, aplicando-se neste caso o termo “estratégia sem gel” (*gel-free*) (120-122).

A identificação em conjunto com a quantificação de proteínas é extremamente importante no estudo de diferentes sistemas, incluindo sub-set do proteoma de diferentes organismos, no qual está incluso o secretoma. A proteômica quantitativa pode ser de dois tipos, a quantificação absoluta, onde a quantidade de uma substância é determinada pela sua concentração na amostra estudada; e a quantificação relativa, que pode ser definida através da relação das quantidades de uma substância em diferentes amostras (123). Além dos tipos de quantificação, existem diferentes métodos de quantificação aproveitados na proteômica, que basicamente podem ser divididos em marcação isotópica estável (*stableisotope-labeling*) ou livre de marcação (*label-free*).

Entre os métodos quantitativos que dependem da marcação das amostras (*label-dependent*) é comum o uso de isótopos que são introduzidos de diferentes formas: adição de um peptídeo análogo isotopicamente marcado (124); incorporação através de uma reação enzimática durante o processo de hidrólise proteica (125); introdução química de um marcador isotópico nos peptídeos ou proteínas (126); e incorporação metabólica da marcação isotópica (127). A quantificação pode ser determinada diretamente através da comparação relativa das intensidades dos sinais no espectro de MS ou com a determinação das áreas dos picos dos íons extraídos do cromatograma (123, 128). Uma das estratégias que contempla o uso de marcadores isotópicos é o iTRAQ – etiqueta isobárica para quantificação relativa e absoluta (*isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) (129) que consiste basicamente na adição de marcadores isotópicos nos peptídeos para posterior quantificação mediante comparação relativa das intensidades dos sinais de cada marcador no espectro MS.

1.8 Proteínas multitarefa

Com o aumento dos estudos proteômicos em larga escala e de distintas frações celulares, tem sido possível identificar, cada vez com mais frequência, proteínas em locais não esperados ou que não coincidem com a função canônica atribuída a elas. Estes achados coincidem com o reconhecimento das vias não convencionais de translocação de proteínas entre os espaços intracelular e extracelular (130). A partir destas observações, foi proposta a denominação de “proteínas multitarefa” ou “*moonlighting*” para aquelas proteínas que desenvolvem duas ou mais funções diferentes em distintos compartimentos celulares; este

fenômeno foi inicialmente conhecido como “*gene sharing*” (130, 131). Proteínas multitarefas ou “*moonlighting proteins*” são proteínas com a capacidade de realizar duas ou mais funções biológicas partindo de uma única cadeia polipeptídica. A habilidade para realizar diferentes funções pode ser entendida como consequência da evolução e/ou o caminho seguido pelas células para desenvolver diversidade funcional com um número limitado de genes (132), para responder às mudanças ambientais e/ou para fornecer um mecanismo de retroalimentação (133). Uma proteína pode alternar entre diferentes funções dependendo de: (i) modificações pós-traducionais; (ii) localização celular, (iii) tipo celular, (iv) concentração de ligantes celulares, substratos, cofatores, produtos; e/ou (v) estímulos externos (132, 133).

Proteínas multitarefa podem ser caracterizadas por estudos proteômicos, particularmente quando são identificadas em locais inesperados, tipos de células, organelas ou complexos multiproteicos alternativos que possam sugerir uma função adicional. Muitos exemplos de proteínas multitarefas com diversas funções biológicas têm sido descritas para diferentes organismos (134-139), sugerindo que aquelas proteínas “*moonlighting*”, não são exclusivas de organismos superiores e executam várias funções de forma autônoma e não relacionada, sem precisar dividir suas funções em diferentes domínios da proteína (139). De fato, muitas proteínas identificadas *bona fide* na secreção de distintas linhagens e tipos celulares apresentam uma função canônica intracelular e, visto que não é possível associar proteínas *moonlight* com mecanismos de secreção não convencionais exclusivamente, resta sugerir que a secreção de proteínas seja um processo muito mais dinâmico e complexo do que descrito anteriormente (140-143).

1.9 Secretoma e seu papel no processo de infecção

Os complexos sistemas de comunicação em diferentes organismos têm sido alvo de estudo para entender as regras que regem as atividades celulares básicas e a coordenação de ações celulares específicas. Exemplos de mecanismos de comunicação incluem a produção de ferormônios nas sociedades de insetos, o canto dos pássaros e a linguagem nos seres humanos (144). A comunicação celular é onipresente: em células tumorais, por exemplo, é observado um perfil de secreção de proteínas diferente daquele observado no tecido normal, e esse secretoma desempenha um papel chave na progressão do câncer (145). Organismos simples,

como bactérias, apresentam complexos mecanismos de comunicação célula-célula; por exemplo, a secreção de determinados sinais que são acumulados no ambiente permite que sejam “sentidos” pelo conjunto da população e pode desencadear uma resposta em conformidade com o estímulo (144). Esta forma de comunicação célula a célula existe tanto em organismos unicelulares quanto pluricelulares, e é aproveitada por muitos organismos heterólogos para se comunicar; inclusive, esta forma de comunicação é usada por patógenos durante a interação com o hospedeiro.

As interações parasito-hospedeiro envolvem uma comunicação dinâmica, que pode ser modulada pela secreção direta de moléculas ou através de distintas classes de vesículas extracelulares as quais são responsáveis pela transferência de diferentes tipos de moléculas (proteínas, peptídeos, microRNA) (146). As moléculas secretadas, em particular proteínas, são as principais mediadoras da comunicação entre células e participam de diversos processos fisiológicos, como a sinalização celular, diferenciação, invasão, disseminação, apoptose, adesão, entre outros (147). O processo de secreção pode ser considerado como o transporte ativo de uma ou varias proteínas do interior para o exterior da célula, e costuma ser um processo estimulado por um sinal específico (148). O termo secretoma foi utilizado pela primeira vez por Tjalsma e colaboradores na descrição de proteínas secretadas por *Bacillus subtilis* (149) e agora é amplamente utilizado para descrever esta subpopulação de proteínas de um organismo. O secretoma de diferentes patógenos (bactérias, fungos, protozoários, e vírus) modula a resposta imune durante a interação do agente patogênico com as células hospedeiras, mediando a sua invasão e sobrevivência (150).

Um resumo dos possíveis mecanismos pelos quais proteínas citosólicas podem atravessar a membrana plasmática foi descrito por Radisky e colaboradores e é mostrado na Figura 1.3 (141). O primeiro mecanismo é o conhecido como convencional, via retículo endoplasmático (RE) – Golgi e envolve a presença de uma variedade de peptídeos sinal (151). Este processo começa com a síntese de proteínas no ribossomo; as proteínas que serão secretadas ou direcionadas para a membrana apresentam uma seqüência específica que permite o reconhecimento e translocação do ribossomo e a proteína nascente para o RE (Figura 1.3, passo 1). Essa seqüência é conhecida como peptídeo sinal. Após a correta conformação e enovelamento da proteína no RE, as proteínas são capturadas em vesículas de transição, que são translocadas para o Golgi (Figura 1.3, passo 2). Posterior à fusão

com o Golgi, as proteínas sofrem processos de maturação adicionais que envolvem modificações pós-traducionais e as quais alteram a conformação, destino e função da proteína (Figura 1.3, passo 3). Depois de sofrer o processo de maturação, as proteínas são transportadas para a superfície da célula mediante vesículas, onde finalmente são secretadas (Figura 1.3, passo 4) (141).

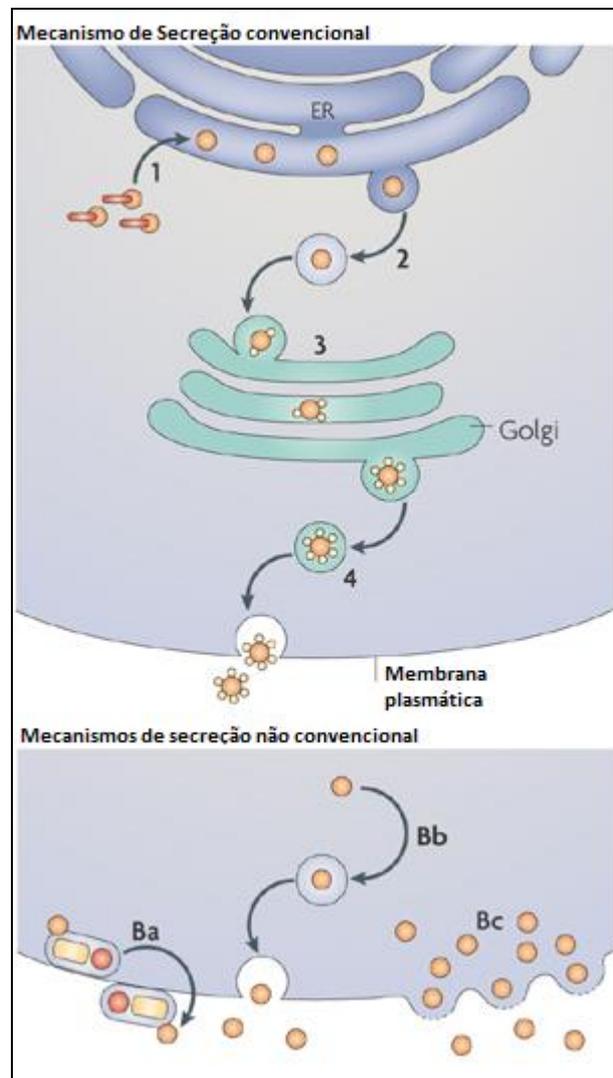


Figura 1.3. Mecanismos de secreção de proteínas. Adaptado de Radisky et al. 2009. Mecanismo convencional via retículo endoplasmático (RE) – Golgi envolvendo diferentes passos (1, 2 e 3) para exportação de proteínas. 3 mecanismos não convencionais (Ba, Bb e Bc) que não envolvem peptídeo sinal (141).

Além da via secretória convencional descrita anteriormente, têm sido propostas pelo menos cinco vias alternativas pelas quais as proteínas que não possuem peptídeo sinal podem ser exportadas; estas vias são denominadas mecanismos não convencionais de secreção (130, 141). Um dos mecanismos propostos supõe o trânsito da proteína livre diretamente pela membrana citoplasmática, unicamente pela associação com complexos especializados de

cotransporte; ali, a proteína é translocada para fora da célula (Figura 1.3, passo Ba). O segundo mecanismo não convencional compreende o transporte de proteínas mediante lisossomos ou vesículas que são fusionadas com a membrana plasmática para serem liberadas no espaço extracelular (Figura 1.3, passo Bb). O terceiro mecanismo alternativo consiste no *flipping* transmembranaral, através do qual, proteínas são translocadas e liberadas ao espaço extracelular (130, 141). Um quarto mecanismo envolve micropartículas denominadas ectossomos, que são microvesículas que são vertidas (“*shedding*”) pela membrana plasmática de células estimuladas ou apoptóticas por “*blebbing*” ou protrusão da membrana em resposta a um sinal extracelular e aumento de Ca^{2+} intracelular (Figura 1.3, passo Bc) (130, 141, 152, 153). O quinto mecanismo envolve a secreção por exossomos, derivados de corpos multivesiculares de origem endosomal, que são liberados para o meio (141, 154, 155). Embora os corpos multivesiculares sejam responsáveis pela entrega de proteínas no citoplasma para sua posterior degradação mediante a fusão com lisossomos (156), eles podem também se fundir com a membrana plasmática para liberar exossomos, e seu conteúdo, no espaço extracelular (130, 152, 153, 155).

Leishmania spp., bem como outros parasitos, secreta para o meio extracelular diversas proteínas que exercem um papel importante na interação parasito-hospedeiro (157-160). A sobrevivência do parasito em seus distintos hospedeiros envolve mecanismos de transporte e secreção de moléculas que medeiam a comunicação célula-célula (161). Além de alguns fatores de virulência expostos na superfície da membrana, como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de 63 kDa, GP63, que podem ser liberados por *shedding* (162), *Leishmania* secreta ativamente uma variedade de moléculas, gerando inúmeras possibilidades de interação do parasito com as células hospedeiras. As proteínas secretadas por *Leishmania* nos primeiros momentos da infecção têm um papel importante no recrutamento de neutrófilos, macrófagos e de outras células fagocíticas profissionais para o local da infecção, sendo assim crucial para a sobrevivência dos promastigotas (68). Uma vez que os parasitos entram em contato com as células fagocíticas e/ou são internalizados, secretam diversas moléculas que podem modular a ativação do macrófago, subvertendo o começo de uma resposta apropriada frente à infecção (162). Desta forma, o estudo integral do secretoma de *Leishmania* possui inquestionável interesse.

Os secretomas de *L. (L.) donovani* (117), *L. (L.) mexicana* (118), *L. (L.) infantum* (163) e *L. (V.) braziliensis* (116), bem como do tripanosomatídeo próximo *T. cruzi* (164), têm sido descritos na última década usando diversas abordagens proteômicas. No caso do secretoma de *L. (V.) braziliensis* reportado pelo nosso grupo em 2009, observamos uma concordância de ~95% com as proteínas identificadas na secreção das outras espécies de *Leishmania* (116-118, 163). Embora estes trabalhos apresentem diferenças nas técnicas proteômicas utilizadas, no número de proteínas identificadas, no tratamento da fração proteica analisada, entre outras, estes coincidem em identificar proteínas envolvidas em sinalização celular, sobrevivência e virulência do parasito para o hospedeiro. Estes estudos também coincidem em observar que a maioria (> 60%) das proteínas secretadas pelos parasitos são liberadas por mecanismos não clássicos, possivelmente baseados em exossomos (116-118, 163, 164), abrindo assim as portas para o estudo dos mecanismos de liberação de proteínas nestes protozoários (165).

Tem sido observado que os exossomos secretados por *L. (L.) donovani* interagem com monócitos humanos *in vitro* modulando a liberação de citocinas anti-inflamatórias, principalmente IL-10, a qual favorece o estabelecimento da infecção (166). Entre as proteínas secretadas por exossomos no citosol do macrófago está o fator de alongação-1 α (EEF1A1) e a enzima glicolítica fructose-bifosfato aldolase, observadas fora do vacúolo parasitóforo (PV) de macrófagos infectados com *L. (L.) donovani* (68, 165, 167). Foi reportado que a enzima fructose-bifosfato aldolase interage, no citosol do macrófago, com a tirosina fosfatase 1 que desfosforila proteínas cinase necessárias para a ativação do macrófago (68).

A hipótese que *Leishmania* e outras células secretam proteínas como mecanismo de invasão e sobrevivência, faz com que o estudo desta fração de proteínas seja relevante para esclarecer o papel do parasito no desenvolvimento das distintas manifestações clínicas, especificamente durante o processo inicial de infecção e ativação dos macrófagos (68, 165).

1.100 problema abordado nesta tese: a associação de cepas de *L. (V.) braziliensis* com o desenvolvimento da manifestação cutânea ou disseminada da LTA

Como *L. (V.) braziliensis* faz metástase? Como se explica que apenas em algumas infecções ocorre disseminação do parasito? Para responder estas questões, desde o ângulo do papel do parasito, propomos como hipótese que a disparidade no desfecho clínico de infecções com *L. (V.) braziliensis* seja devida a diferenças intrínsecas dos parasitos, particularmente no seu secretoma, que modulam a sua patogenicidade para o hospedeiro vertebrado. Esta hipótese foi proposta com base nas seguintes evidências: (i) *L. (V.) braziliensis* foi isolada de pacientes com distintas manifestações clínicas da LTA, desde formas cutâneas simples autorresolutivas até formas disseminadas de difícil tratamento; (ii) estudos em modelos experimentais de infecção com *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* demonstraram que tanto espécies quanto cepas diferem na capacidade de disseminar e causar lesões metastáticas em hamster dourado (168); (iii) clones de uma cepa metastática de *L. (V.) guyanensis* variaram em sua capacidade de causar metástase em hamster e essa capacidade é estável no tempo (169); (iv) estudos em modelos de primatas rhesus mostraram que a infecção com uma cepa isolada de um paciente com forma cutânea localizada cursou da mesma forma nos animais, apresentando autorresolução (89), ao passo que a infecção com uma cepa de um paciente com forma disseminada causou múltiplas lesões disseminadas em 100% dos macacos (96). Estas evidências sugerem que os parasitos que disseminam podem ser distinguidos daqueles que não o fazem.

A fim de avaliar a hipótese acima mencionada, escolhemos estudar o secretoma de duas cepas de *L. (V.) braziliensis* associadas (i) à forma cutânea simples e (ii) à forma disseminada da doença e as quais foram previamente caracterizadas no modelo rhesus (89, 96). Estas cepas provêm de uma mesma região geográfica, pertencem ao mesmo zimodema, tiveram o tempo de manutenção *in vitro* controlado e sua capacidade infectiva foi mantida.

O uso de metodologias proteômicas para a análise em larga escala das proteínas secretadas pelos parasitos permite a identificação de proteínas envolvidas na interação parasito-hospedeiro. A identificação de proteínas secretadas para o meio extracelular que possam exercer algum papel nos mecanismos de metástase ou progressão da infecção, bem como no comprometimento da resposta imune do

hospedeiro, pode contribuir para a definição da estratégia que o parasito utiliza para causar as formas mais graves da doença e entender o mecanismo de evasão do parasito nas primeiras etapas de infecção. Tais resultados poderiam ajudar no desenvolvimento de novas terapêuticas e a elaboração de vacinas para estas patogenias, com direcionamento para alvos celulares específicos conhecidos.

2 JUSTIFICATIVA

Já que as proteínas secretadas pelos parasitos podem estar diretamente relacionadas às diferenças na virulência das cepas, a identificação e quantificação comparativa do secretoma de cepas de *L. (V.) braziliensis* associadas a manifestações clínicas polares da LTA (cutânea localizada autorresolutiva e cutânea disseminada) podem fornecer luzes sobre o papel do parasito no processo de disseminação metastática em infecções com este protozoário. Adicionalmente, o estudo proteômico combinado com a análise de interação com macrófagos pode ajudar a entender o papel das proteínas secretadas nos eventos iniciais de infecção, visto que diferenças na composição proteica do secretoma podem afetar favorável ou desfavoravelmente a proliferação do parasito no macrófago mediante modificações do mecanismo de ativação da célula hospedeira.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar e analisar proteínas secretadas por cepas de *L. (V.) braziliensis* isoladas de pacientes com manifestação cutânea localizada e disseminada da leishmaniose tegumentar americana.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Realizar análise proteômica quantitativa comparativa entre os secretomas de duas cepas de *L. (V.) braziliensis* associadas às formas cutânea localizada e disseminada da doença.
- b. Avaliar o efeito das proteínas secretadas pelos promastigotas sobre a infecção de macrófagos peritoneais de camundongo com *L. (V.) braziliensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo de *L. (V.) braziliensis* e ensaios de secreção de proteínas

As cepas de *L. (V.) braziliensis* usadas neste estudo estão depositadas na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, CLIOC, e correspondem a parasitos associados com manifestação clínica disseminada (IOC-L 2483, MHOM/BR/2000/LTCP-13396) ou manifestação clínica cutânea localizada (IOC-L 2481, MHOM/BR/2000/LTCP-13490) (Tabela 4.1). Ambas as cepas foram previamente caracterizadas pela CLIOC e foram mantidas infectivas por passagens em hamster. Os parasitos foram mantidos a 25 °C em meio bifásico NNN-Schneider (Vitrocell) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell) e 2% urina. Os ensaios de secreção de proteínas foram feitos como descrito previamente por Cuervo et al. (116), com pequenas modificações. Em resumo, 5×10^8 promastigotas coletados em fase logarítmica tardia da curva de crescimento, foram lavados, resuspendidos em 5 mL de meio para secreção [RPMI (Gibco) suplementado com 25 mM HEPES] e incubados por 3 h a 25 °C. Durante o ensaio, a viabilidade celular foi medida a cada hora por citometria de fluxo mediante marcação com iodeto de propídeo (PI). Posteriormente, as suspensões celulares foram centrifugadas a 4000 rpm por 15 min a 4 °C e os sobrenadantes resultantes foram novamente centrifugados a 14000 rpm por 25 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados para os ensaios posteriores. Os ensaios foram feitos em quadruplicata biológica.

Tabela 4.1. Descrição dos isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* provenientes de pacientes com distintas apresentações clínicas da LTA

Isolados		Manifestação clínica	Origem
Código CLIOC	Código Internacional		
IOC-L 2483	MHOM/BR/2000/LTCP 13396	Disseminada	Bahia, Brasil
IOC-L 2481	MHOM/BR/2000/LTCP 13490	Cutânea localizada	Bahia, Brasil

4.2 Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo

Para avaliar a viabilidade celular dos parasitos em cada ensaio de secreção, 100 µL da suspensão celular foram lavados com PBS e resuspendidos em meio RPMI fresco para obter uma densidade celular de 5×10^5 células/mL. Para o controle positivo de morte celular, 5×10^5 células/mL foram permeabilizadas mediante incubação com 1% BSA e 0.1% de saponina em PBS durante 15 min a 25°C e lavadas posteriormente com PBS. Depois, tanto as células controle como as células do ensaio foram incubadas com 2 µL PI (1mg/mL) a 25 °C durante 20 min protegidas da luz. Após o tempo de incubação, a viabilidade celular foi determinada através da análise da fluorescência do PI em citômetro de fluxo FACSCanto™ (Becton Dickinson, USA), usando o filtro de 625/35 nm. Esta análise foi feita em colaboração com o Dr. Luiz Ricardo Berbert do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, IOC. Os dados foram analisados no software Summit™.

4.3 Digestão de proteínas, marcação por iTRAQ e cromatografia de troca iônica.

Os sobrenadantes foram concentrados por centrifugação a 4000 g utilizando o sistema de Millipore Amicon® *Ultra Centrifugal Filters* 3K até obter um volume final de 100 µL para cada amostra. Após, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) (15% v/v) por 2 h a 4 °C, e lavadas 2 vezes com acetona fria e centrifugadas a 14000 rpm por 15 min a 4 °C. Finalmente as proteínas foram resuspendidas em tampão TEAB (bicarbonato de trietilamônia 50 mM pH 8,5) e dosadas por fluorimetria usando o sistema Qubit (*Invitrogen's Qubit® quantitation fluorometer*). Para a digestão, 100 µg de proteína foram solubilizados com 0.1% (w/v) de RapiGest (*Waters*) e, em seguida, reduzidas pela adição de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 20 mM, a 60 °C, por 30 min e alquiladas protegidas da luz com Iodoacetamida 20 mM (IAA), em TEAB 50 mM, por 30 min, a 25 °C. Posteriormente, adicionou-se lisil-endopeptidase (LEP, Wako) em relação enzima:substrato de 1:100 (w:w) e incubou-se por 4 h a 37 °C. A tripsina (Promega) foi adicionada em relação enzima:substrato de 1:50 (w:w) incubando por 16 h a 37 °C. Após a digestão, as amostras foram acidificadas com 1% de ácido fórmico, para deter a ação da enzima, e centrifugadas a 14000 rpm por 15 min para remover os

materiais insolúveis. Antes da marcação por iTRAQ, os peptídeos foram dessalinizados usando Spin Column C18 (Harvard Apparatus, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. A estratégia de marcação é mostrada na Figura 4.1. Os peptídeos foram resuspendidos em 30 μ L de TEAB 50 mM, dosados por fluorimetria usando o sistema Qubit e marcados com iTRAQ 4-plex (*Applied Biosystem*) de acordo com o protocolo do fabricante. Os peptídeos marcados foram misturados e fracionados por troca catiônica forte pH 3.0 usando Macro Spin Columns (Harvard Apparatus, USA). As duas frações resultantes, uma não retida na coluna de troca iônica e a outra eluída com 350 mM de KCl, foram secas em um sistema de centrifugação a vácuo e novamente dessalinizadas usando Spin Column C18 (Harvard Apparatus, USA).

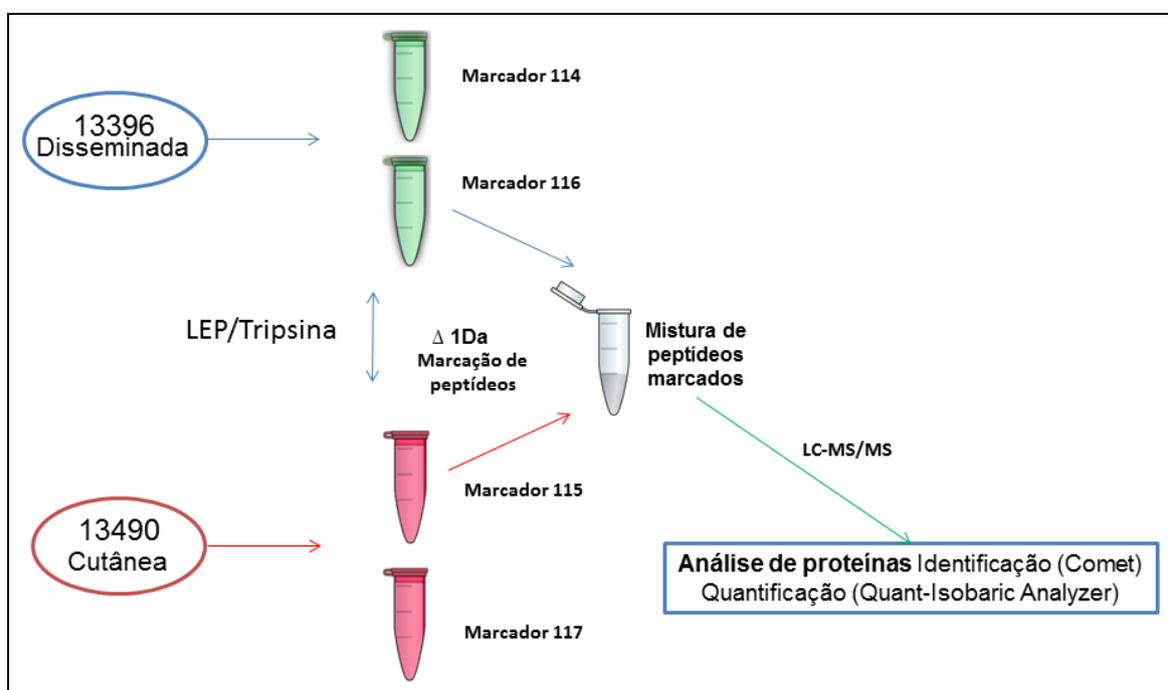


Figura 4.1. Esquema de marcação isotópica. As secreções das duas cepas de *L. (V.) braziliensis* foram digeridas e marcadas mediante metodologia iTRAQ para serem analisadas por espectrometria de massas em quadruplicata biológica de cada cepa.

4.4 Análise por espectrometria de massas

As frações obtidas como descrito acima foram submetidas à análise por nanocromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (nLC-MS/MS). As amostras foram analisadas em duplicata 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 (Thermo Fischer Scientific)*. Neste, 10 µL de 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* (esferas de 1.9 µm de diâmetro, Dr. Maisch) usando um fluxo de 500 nL/min. O fracionamento dos peptídeos ocorreu com um fluxo de 250 nL/min. A fase móvel A consistiu de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), 0.1% de ácido fórmico em água e a fase móvel B de 5% de DMSO, 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila. Os peptídeos foram separados mediante a aplicação do gradiente cromatográfico de 5 a 40% da fase B por 180 minutos.

Os peptídeos eluíram do cromatógrafo diretamente no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL-ETD (*Thermo Fischer Scientific*), para aquisição dos espectros. Para ionização *nanoelectrospray* dos peptídeos, foi ministrada uma voltagem de 2.3 kV e a temperatura do capilar de transferência de íons foi 175 °C. Os dados foram adquiridos em modo DDA (*data dependent acquisition*), alternando automaticamente entre a aquisição do *full scan* MS e MS/MS, com uma exclusão dinâmica de 90 s. A varredura inicial do MS (*m/z* 300-2000) foi feita com uma resolução de 60.000. Para cada espectro MS, até cinco íons mais intensos com carga 2+ e 3+ foram isolados, um de cada vez, e fragmentados por dissociação por colisão em alta energia (HCD) usando gás argônio, uma energia de colisão normalizada de 45 e um tempo de ativação de 30 ms. Todas as funções de *scan* do espectrômetro de massas e os gradientes dos solventes no nLC foram controlados pelo *software Xcalibur 2.0 (Thermo Fischer Scientific)*.

4.5 Identificação de peptídeos e banco de dados usados para identificar as proteínas secretadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Tanto a identificação dos peptídeos quanto sua quantificação foi feita em estreita colaboração com o Dr. Paulo Carvalho do Instituto Carlos Chagas da Fiocruz, PR. Para a identificação, os arquivos .RAW foram analisados com uma estratégia de PSM (*Peptide-Spectrum Match*) usando o programa Comet PSM da plataforma PatternLab (170-172) e uma base de dados contendo 51,195 entradas

para o gênero *Leishmania*, obtida do banco UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>) em Janeiro de 2015. Foi usada a base de dados para o gênero *Leishmania* porque ela contém, além das seqüências anotadas de *L. (V.) braziliensis*, seqüências de outras espécies como *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum* que têm sido amplamente usadas e estão melhor curadas, o que permitiria diminuir a possibilidade de identificar proteínas não caracterizadas, hipotéticas ou simplesmente com menor score devido a possíveis erros na anotação de *L. (V.) braziliensis*. Durante as buscas foi aceita uma taxa de identificações falsas (FDR – *False Discovery Rate*) de peptídeos e proteínas menor ou igual a 1 (1% FDR), usando uma base de dados *target-decoy reverse*, a qual foi composta por: (i) a base de dados de *Leishmania* descrita acima, (ii) essas mesmas seqüências de *Leishmania* escritas no sentido contrário, e (iii) contaminantes comuns disponíveis no “*PatternLab’s Search Database Generator*” da plataforma PatternLab (170-172). Os parâmetros de busca consistiram em peptídeos aceitos até com três clivagens perdidas (“*missed cleavage*”), carbamidometilação de cisteína e iTRAQ (+144.1 Da) no N-terminal como modificações fixas e iTRAQ (+144.1 Da) na cadeia lateral da lisina como modificação variável; 40 ppm de tolerância de massa para o precursor e 1,005 Da de tolerância para os íons fragmento.

A validação dos peptídeos identificados com o Comet foi feita usando o *Search Engine Processor* (SEPro), também da plataforma PatternLab (172, 173). Em resumo, as identificações foram agrupadas por carga (+2 e +3) e depois por estado tríptico (tríptico, semi-tríptico). Adicionalmente, foi estabelecido um valor de seis resíduos como comprimento mínimo dos peptídeos identificados. Os resultados foram posteriormente processados para aceitar só seqüências com menos do que cinco ppm de erro e duas ou mais evidências independentes de presença do peptídeo na amostra, *i.e.*: 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. Após da validação com SEPro, as proteínas identificadas no banco de dados correspondentes a espécie *L. (V.) braziliensis*, bem como a algumas outras espécies, foram aceitas e curadas manualmente.

4.6 Quantificação das proteínas secretadas por cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* associadas a distintas manifestações clínicas da LTA

A quantificação relativa das proteínas foi feita usando o programa *Quant-Isobaric Analyzer* da plataforma PatternLab for Proteomics (170, 172). A partir do arquivo SEPro e usando as marcações 114.1 e 116.1 para as proteínas da cepa disseminada e 115.1 e 117.1 para a cepa cutânea, foi gerado um relatório de peptídeos quantificados, aplicando-se uma correção de pureza própria do programa para os diferentes marcadores e uma normalização do sinal do canal que basicamente soma os sinais de todos os espectros para cada canal (i.e., marcador isóbaro) e os valores normalizados para cada um dos espectros obtidos através da divisão de cada sinal de íons repórter pela soma do canal correspondente (172). Após gerar a lista, foi feita uma análise de duas classes também no SEPro (comparação das duas cepas: marcadores 114 e 116 usados para a cepa disseminada e 115 e 117 para a cepa cutânea), com valores *cutoff* de mínimo 2 peptídeos por proteína, 0.30 de Log do *Fold Change* (“*peptide Log Fold Change Cutoff*”) e 0.05 de p-valor para os peptídeos. Peptídeos que aparecem apenas numa condição biológica têm baixos p-valores binomiais. O p-valor do teste t pareado, por outro lado, indica se o peptídeo tem uma diferença estatística na média dos íons repórteres quando são comparadas duas condições biológicas (172), neste caso, disseminada vs. cutânea. Finalmente, o p-valor corrigido foi calculado de acordo com o procedimento Benjamini-Hochberg (172). A lista final da quantificação foi exportado para Microsoft Excel e curado manualmente, aceitando proteínas diferencialmente expressas com *Fold change* ≥ 1.5 e $p \leq 0.05$.

4.7 Análise bioinformática das proteínas identificadas

Para analisar funcionalmente as proteínas identificadas no meio condicionado de secreção de *L. (V.) braziliensis* foram usadas diferentes ferramentas bioinformáticas que são descritas a seguir.

4.7.1 Ontologia gênica

Cada proteína identificada e listada foi classificada de acordo as três principais categorias de ontologia gênica e em suas respectivas subcategorias. Desta forma as proteínas foram agrupadas de acordo a sua função molecular, localização celular e processo biológico usando a ferramenta de Gene Ontology Explorer (GOEx) da plataforma PatternLab (172, 174). Os resultados foram classificados e exportados para diferentes tabelas dependendo da categoria assinalada para cada proteína.

4.7.2 Predição de domínios, localização celular e mecanismo de secreção

Além da classificação ontológica, foi feita uma predição de domínios funcionais para as proteínas de função desconhecida usando o programa Pfam v 27.0 (*European Bioinformatics Institute*, <http://pfam.xfam.org/>) (175). Além disso, todas as proteínas identificadas foram analisadas com diferentes programas para validar sua qualidade de proteína secretada. Assim, foi feita (i) uma análise de predição de peptídeo sinal para eucariotos usando o servidor SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>); (ii) uma análise de predição de secreção não convencional usando o servidor SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>), sendo aceitas proteínas que apresentaram $NN\text{-score} > 0.5$ quando a predição foi feita usando o algoritmo para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e $NN\text{-score} > 0.6$ quando a predição foi feita usando o algoritmo para mamíferos; (iii) uma análise de predição de localização subcelular usando o programa TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>); (iv) uma análise de predição do número de hélices transmembrana usando o programa TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); e finalmente (v) uma busca, por similaridade, contra o banco de dados de proteínas secretadas por via exossomal, usando ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>) (176-182) .

4.7.3 Interactoma

Para tentar aprofundar na interpretação funcional dos dados de proteômica comparativa, as proteínas quantificadas e encontradas como diferencialmente abundantes nos secretomas das cepas foram analisadas usando a plataforma *Integrated Interactome System (IIS)*, acessível de maneira livre na rede

(<http://www.lge.ibi.unicamp.br/lnbio/IIS/>) (183), usando os genes ortólogos em humanos. A partir dos dados do IIS foi construída a rede de interação das proteínas diferencialmente abundantes em cada cepa usando o programa Cytoscape versão 2.8.3 (<http://www.cytoscape.org/>) (184).

4.7.4 Comparação das proteínas identificadas na secreção de *L. (V.) braziliensis* com o banco de dados de proteínas multitarefas

Para enriquecer as informações sobre as proteínas identificadas na secreção, foi feita uma análise comparativa frente ao banco de dados de proteínas multitarefas disponível no site <http://wallace.uab.es/multitask/> (185). Para esta análise, foi descarregada a informação total das proteínas reportadas como multitarefas para vários organismos (288 proteínas), destacando que não há nenhuma reportada para *Leishmania*. Posterior à descarga da base de dados, foi feita uma comparação proteína-proteína mediante a ferramenta Protein Blast do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (186, 187), contra as proteínas identificadas na secreção de *L. (V.) braziliensis*. Foram aceitas análises que mostraram percentagens de cobertura superiores a 57.

4.8 Análise de expressão gênica

Para avaliar se a abundância diferencial de proteínas no secretoma poderia correlacionar-se com a abundância relativa dos seus transcritos, foi realizada uma análise de expressão gênica para seis genes das duas cepas usando PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Para tal, o RNA total foi extraído a partir de promastigotas submetidas a ensaio de secreção, (*i.e.* que foram coletadas por centrifugação após o ensaio de secreção), usando o reagente Trizol, de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies, Inc.). O RNA foi quantificado com um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total utilizando o sistema de transcrição reversa SuperScript III (Invitrogen). A qPCR foi realizada em duplicata técnica, utilizando o equipamento e StepOne e SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo do fabricante. Os genes analisados foram: *lip2* (60S acidic ribosomal protein P2, O44010), *Lbrm_18_1400* (Heat shock protein, A4H9P0),

Lbrm_05_0800 (S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase, A4H4C5), *tat* (Tyrosine aminotransferase, A4HPA3), *Lpmp_281290* (Glucose-regulated protein 78, A0A088RUF5), *Lbrm_26_2610* (Uncharacterized protein, A4HFB2) e os genes de referência *Lbrm_04_1250* (Actina, A4H438) e *Lbrm_24_2150* (40S ribosomal protein S8, A4HDR9). Os oligonucleotídeos usados para amplificar estes alvos foram desenhados usando o software Primer Blast a partir das sequências públicas dos genes (Anexo 1). As condições da PCR para cada gene foram otimizadas e as especificidades foram verificadas por análises da curva de fusão (Anexo 1). O perfil de amplificação consistiu de 40 ciclos cada um com 10 s de desnaturação a 95 °C, 15 s de anelamento a 56 °C e 10 s de extensão a 72 °C. As curvas padrão para todos os genes foram geradas utilizando diluições seriadas de cDNA obtidos a partir de todas as amostras. A eficiência de amplificação para cada gene foi obtido na fase exponencial da curva de amplificação usando o software do fabricante. A expressão do gene foi quantificada utilizando o método de Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$). Os dados são mostrados como relações normalizadas entre a expressão do gene alvo e a média geométrica dos genes de referência (188). Os experimentos foram realizados seguindo as orientações MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (189).

4.9 Cultura primária de macrófagos peritoneais e infecção *in vitro* com *L. (V.) braziliensis*.

Para avaliar se a secreção de cada cepa de *L. (V.) braziliensis* poderia modular ou não o percentual de infecção para células de mamífero, macrófagos peritoneais murinos foram pré-estimulados ou não com secreção dos parasitos, infectados e posteriormente analisados por microscopia e citometria de fluxo. Em detalhe, macrófagos obtidos por lavado peritoneal de camundongos Swiss, foram ressuspensos em meio RPMI suplementado com 10% SFB, 4 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 1000 U/mL de penicilina e 50 µg/mL estreptomicina (HyClone). Os macrófagos foram quantificados e plaqueados para obter 3×10^5 macrófagos/poço, em placas de 24 poços contendo lamínulas de 12 mm, e incubados por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂ para adesão. Estes ensaios foram feitos em colaboração com o grupo do Dr. Rubem Menna-Barreto. Após aderência, as células foram lavadas com PBS, pH 7,2 e estimuladas ou não, por 24 h, com 60 µL (~0.6 ug) de meio condicionado

de secreção de cada cepa (disseminada ou cutânea), volume que corresponde ao que seria secretado por 3×10^6 parasitos, que por sua vez corresponde a uma relação de infecção de 10:1 parasitos/macrófago. Após a estimulação, o meio condicionado foi retirado e os macrófagos foram novamente lavados com PBS e infectados ou não com promastigotas de fase log tardia, da cepa correspondente, na proporção de 10:1 (parasito:macrófago) durante 3 h. Após esse período, foram realizadas novas lavagens para retirada dos promastigotas não aderidos e os macrófagos foram incubados por 24, 48 e 72 h. Em cada tempo, os sobrenadantes foram coletados para análise de citocinas secretadas pelos macrófagos, por citometria de fluxo conforme descrito adiante, e as lamínulas foram utilizadas para os estudos de microscopia. Estes ensaios foram realizados em triplicata biológica.

Para as análises por microscopia, os macrófagos foram corados usando o kit de coloração Panótico Rápido e o número de células infectadas, bem como o número de parasitos por célula, foram aferidos através de microscopia de luz. Foram contadas 100 células por lamínula, em triplicata técnica, e o número de amastigotas por célula, no caso dos macrófagos infectados. Além do número de células infectadas e número de parasitos por macrófago, foi avaliada carga parasitária sobre os macrófagos mediante o cálculo do índice de infecção que consiste em multiplicar o número de células infectadas pelo número de parasito por célula em cada tempo (190, 191). A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Para analisar as diferenças entre os grupos controle e pré-estimulado foi aplicado o teste *t* de Student. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão.

4.10 Análise de citocinas secretadas por macrófagos murinos

Os sobrenadantes contendo as secreções dos macrófagos peritoneais foram coletados em 24, 48 e 72h e analisados por citometria de fluxo, através de Kit CBA (*Cytometric Beads Array*) para camundongo (Cat No. 552364, Becton Dickinson, USA) para a quantificação de citocinas relacionadas a perfis pró-inflamatórios e reguladores anti-inflamatórios, incluindo IL-6, IL-10, MCP-1/CCL2, IFN- γ , TNF- α , e IL-12p70. Os tubos para aquisição dos dados foram preparados de acordo com protocolo do kit: 50 μ L de amostra, 50 μ L do complexo de Beads magnéticas específicas para cada citocina e 50 μ L do reagente de detecção. Curvas padrão de detecção também foram preparadas para cada citocina. Os tubos foram incubados

por 2 horas à temperatura ambiente, protegidos da luz. As citocinas foram posteriormente medidas no canal FL2 do citômetro de fluxo FacsCANTO™ (BD, USA) em colaboração com o Dr. Luiz Ricardo Berbert e os dados foram analisados no software FCAP Array Software v3.0™.

4.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Para analisar as diferenças entre as duas condições estudadas foi aplicado o teste *t* de Student. Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 A viabilidade celular de *L. (V.) braziliensis* durante os ensaios de secreção está acima de 97%.

Cepas de *L. (V.) braziliensis* associadas à manifestação clínica cutânea simples e manifestação disseminada foram submetidas aos ensaios de secreção em meio condicionado durante 3 h. Para garantir que, após esse período, as proteínas encontradas no meio condicionado fossem provenientes de secreção ativa e não de liberação por morte celular, a viabilidade dos parasitos foi medida a cada hora por citometria de fluxo mediante marcação com PI. O PI é um marcador nuclear fluorescente que se intercala no DNA de células mortas ou em processo de morte e as quais, portanto, apresentam permeabilidade na membrana celular. A Figura 5.1 apresenta os resultados de viabilidade celular medida para cada cepa durante o período de secreção. Estas medições foram feitas em cada replicata biológica e, em comparação com o controle de parasitos permeabilizados, os parasitos de ambas as cepas apresentaram médias de viabilidade acima de 97% no ponto final do experimento (após 3 h de secreção) (Figura 5.2).

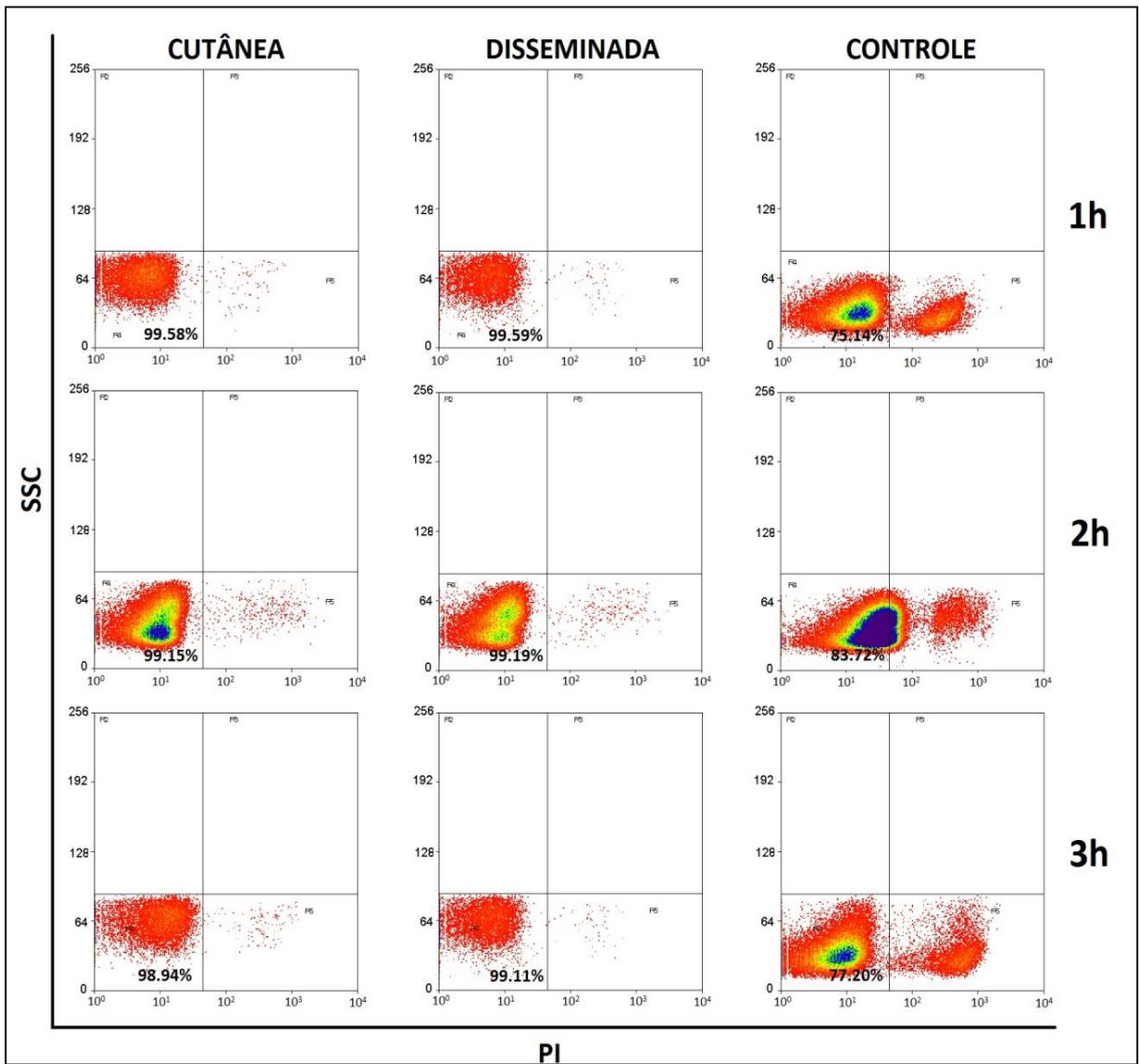


Figura 5.1. Percentagem de viabilidade celular das cepas de *L. (V.) braziliensis*. A viabilidade das cepas durante os ensaios de secreção foi medida por citometria de fluxo como descrito na seção de material e métodos. Plots representativos da viabilidade observada em cada cepa ao longo do experimento. Controle: parasitos permeabilizados com saponina durante 15 min.

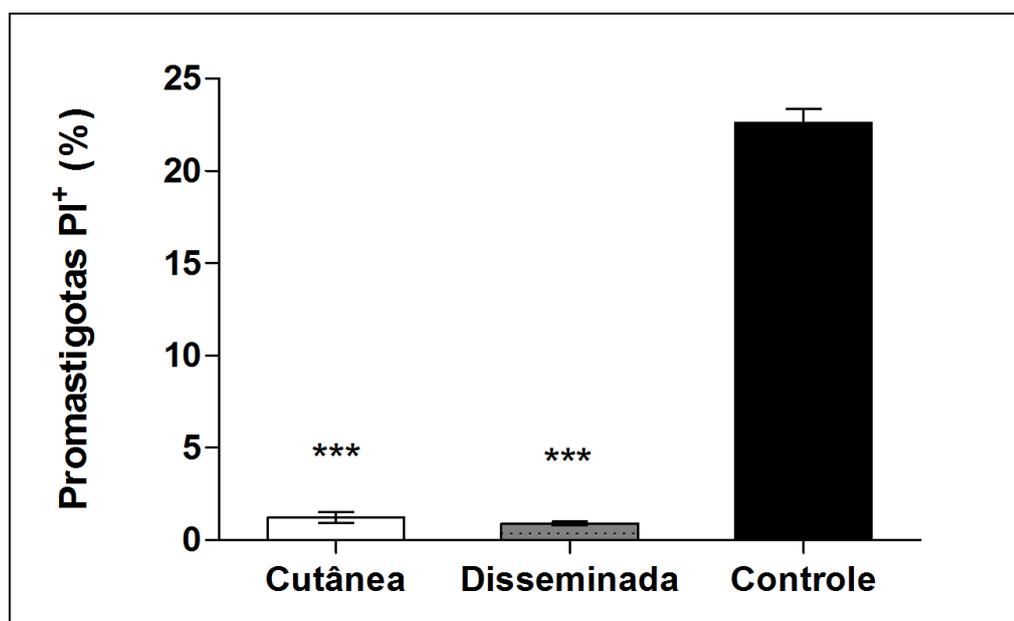


Figura 5.2. Percentagem de promastigotas marcadas com PI no experimento de secreção. A viabilidade celular das cepas estudadas foi medida por citometria de fluxo através da marcação com PI. Os dados representam o percentual médio de parasitos marcados no ponto final do ensaio de secreção (após de 3 horas secretando em meio condicionado). O controle representa promastigotas permeabilizados com saponina durante 10 min. (***) $p < 0,0001$. As barras representam a média \pm desvio padrão.

5.2 O secretoma das duas de *L. (V.) braziliensis* contem proteínas secretadas principalmente por vias alternativas envolvendo exossomos

As proteínas secretadas foram coletadas em quatro ensaios independentes (4 replicatas biológicas para cada cepa) e processadas até obtenção dos peptídeos trípticos, os quais foram modificados pela marcação iTRAQ para quantificação da abundância relativa de proteínas. Após análise por espectrometria de massas foram obtidos, em média, ~4.200 espectros que corresponderam a 1.176 peptídeos identificados. Ao fazer a busca contra a base de dados de *Leishmania* e remover as proteínas redundantes, foram identificadas, por PSM, com FDR de 1%, 252 proteínas presentes nas duas cepas. Destas, 201 (80%) foram identificadas com, no mínimo, dois peptídeos, ao passo que 51 (20%) foram identificadas com um único peptídeo, sendo esse peptídeo único (Tabela 5.1). As proteínas identificadas com apenas um peptídeo foram aceitas como confiavelmente identificadas visto que havia mais de uma evidência da sua presença na amostra (dois ou mais espectros e/ou dois ou mais estados de carga), seguindo as recomendações do desenvolvedor

do software. Oitenta e cinco por cento das proteínas (85%, 213/252) corresponderam a proteínas anotadas para *L. (V.) braziliensis*, ao passo que os 15% restantes (39/252) corresponderam a proteínas de outras espécies de *Leishmania* (Tabela digital 1).

Entre as proteínas identificadas no secretoma de *L. (V.) braziliensis*, identificaram-se proteínas secretadas *bona fide* incluindo GP63, fosfatase ácida secretada, proteína dissulfeto isomerase e o receptor ativado de proteína cinase c, entre outras. A análise das proteínas identificadas usando SignalP 4.1 para predição de peptídeo sinal de secreção (secreção por via clássica) e SecretomeP para predição de secreção por vias alternativas mostrou que apenas 3.9% (10/252) devem apresentar peptídeo sinal, ou seja, são secretadas por via clássica, ao passo que ~48% (120/252) foram preditas como secretadas por vias alternativas (Figura 5.3 Tabela 5.1). Já que uma das potenciais vias alternativas de secreção que tem sido descritas na literatura envolve exossomos, analisamos a similaridade das proteínas aqui identificadas com as proteínas depositadas na base de dados ExoCarta. Este banco de dados alberga, entre outros, evidências de proteínas secretadas via exossomos nos principais modelos biológicos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Drosophila melanogaster*, entre outros). Esta análise mostrou que ~49% (123/252) das proteínas aqui identificadas são secretadas por exossomos, destas, ~54% (66/123) não apresentaram predição pelo SignalP nem pelo SecretomeP. Assim, para ~78% (196/252) das proteínas aqui identificadas foi possível determinar uma via potencial de secreção, ao passo que para ~22% (56/252) não foi possível identificar nenhum sinal de secreção clássico ou alternativo reconhecido. Estas proteínas podem alcançar o espaço extracelular por uma via ainda não relatada até o momento (Figura 5.3).

Além disso, a análise de predição de localização celular usando o servidor TargetP 1.1 mostrou que 5% (13/252) das proteínas identificadas apresentam peptídeo sinal, indicando que são secretadas, ao passo que 12.7% (32/252) apresentam predição para localização mitocondrial. Finalmente, usando o servidor TMHMM encontramos que 8.7% (22/252) contêm predição de domínio transmembranaral (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Proteínas identificadas na secreção de *L. (V.) braziliensis*. Proteínas identificadas no meio condicionado de secreção das duas cepas de *L. (V.) braziliensis*. As proteínas foram identificadas por PSM usando o programa Comet e uma base de dados “customizada” contendo as seqüências de proteínas de *Leishmania* depositadas na base de dados UniProt (~51,000 seqüências, em Janeiro de 2015).

Id Uniprot	Nome	Peptídeos identificados	Espectros associados	Cobertura (%)	Peptídeos únicos	^a Secretome_P	^b Signal_P	^c Target_P	^d TMHMM	^e ExoCarta
A4HFH6	Calpain-like cysteine peptidase	25	34	5	25					Exo
A4HGY1	Heat-shock protein hsp70	21	135	34	13	G- (0.54)				Exo^
A4HL70	Heat shock protein 83-1	18	98	26	18					Exo
Q2HZY7	Elongation factor 2	18	87	24	18					Exo
A0A088RIB2	Dipeptidyl-peptidase III,	17	62	27	10					Exo
A4HPQ8	Adenosylhomocysteinase	16	87	37	16					Exo
A4H638	GP63, leishmanolysin	15	43	22	15	G- (0.64)		M(0.74)	NoHelix=1	
A4HII0	Heat shock 70-related protein 1,mitochondrial	12	70	21	1			M(0.77)		Exo
A4HIW5	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocystein e S-methyltransferase	12	35	18	12					Exo
A4HQ26	Uncharacterized protein	12	28	15	6	G- (0.95) G+ (0.82)				
A4H727	Alpha tubulin	11	68	26	11					Exo
A4H618	Aminopeptidase	11	51	27	11	G- (0.58)				
Q25225	Probable eukaryotic initiation factor 4A	11	44	25	11					Exo
A4H716	Carboxypeptidase	11	41	25	11					Exo^
A7UFI6	Malate dehydrogenase	11	38	37	11	G- (0.72)		M(0.63)		Exo
A4HMB3	Aspartate aminotransferase	10	51	24	10					
A4H9P0	Heat shock protein	10	39	12	10					
A4H7T6	Enolase	9	57	27	9					Exo
A4H3T9	Uncharacterized protein	8	68	22	0		Y(0.91)	S(0.98)		
A4HKT7	Nucleoside diphosphate kinase	8	58	34	0	G+ (0.68)		M(0.63)	NoHelix=1	Exo
E9JUH4	Trypanothione reductase	8	36	12	2					Exo
A4HPA3	Tyrosine aminotransferase	8	36	25	8					
A4H5Q8	Oligopeptidase b	8	27	10	8					
A4H7K5	Uncharacterized protein	8	23	27	8	G- (0.85)				
A4HN85	Poly(A)-binding protein 2	8	14	12	8	G- (0.69)				Exo^
A4H5R9	Calmodulin	7	39	49	7					Exo
A4H746	40S ribosomal protein S12	7	33	44	7	M (0.60)				Exo

A4HF12	Thimet oligopeptidase	7	33	13	4					Exo
A4HM16	Uncharacterized protein	7	29	2	0					
A4HCL7	Peroxidoxin	7	23	24	4	M (0.78)		M(0.81)		
A4H9F9	Aconitate hydratase	7	21	8	7			M(0.61)		
A4H643	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	7	20	24	7	M (0.61)			NoHelix=1	Exo
A4HIY0	Paraflagellar rod protein 1D	7	20	14	7					
A0A088RMD6	Paraflagellar rod protein 2C	7	19	12	2					
E9AWE0	T-complex protein 1 subunit gamma	7	19	13	7			M(0.61)		Exo
A4HE10	Uncharacterized protein	7	16	19	5					
A0A088RUF5	Glucose-regulated protein 78,	7	8	12	5		Y(0.83)	S(0.97)	NoHelix=1	Exo
A4HAJ7	Translation elongation factor 1-beta	6	34	21	1	G- (0.85) M (0.67)				Exo
A4HQG9	Histidine secretory acid phosphatase	6	33	16	0		Y(0.71)	S(0.70)		Exo
A4HM36	Pyruvate kinase	6	31	12	0			M(0.54)		Exo
A4HAX5	Uncharacterized protein	6	30	27	6	G- (0.58)				
A0A088SAQ9	Triosephosphate isomerase	6	28	26	6					Exo
A4H6F2	14-3-3 protein	6	27	30	6					Exo^
A0A088S1G0	Proteasome alpha 1 subunit,	6	27	21	6					Exo
A4H879	Tryparedoxin peroxidase	6	25	14	4					
A4H7H9	Uncharacterized protein	6	24	35	6					
A4HKX6	Dihydrolipoyl dehydrogenase	6	23	15	6					
A4HFU7	Uncharacterized protein	6	23	19	6	G- (0.95) G+ (0.89) M (0.63)				
A0A088S299	Phosphomannomutase,	6	22	27	3					Exo
A4HQI8	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	6	20	16	6					Exo
A4H8V4	Elongation factor 1-alpha	6	20	12	6	G- (0.56)				Exo
A4HMF2	Ubiquitin-conjugating enzyme e2	6	20	41	6	G- (0.91) G+ (0.84) M (0.83)				Exo
A4HJV3	Phosphoglycan beta 1,3 galactosyltransferase 5	6	17	7	3			M(0.55)		
A4HKX2	T-complex protein 1 subunit alpha	6	14	12	6			M(0.71)		
A0A088RKB9	Argonaute/dicer protein-like protein	6	8	5	2	G- (0.50)				
A4HFB9	Polyubiquitin,	5	44	6	0					
A0A088RSB5	Translationally controlled tumor protein (TCTP),	5	37	21	2					Exo
A0A088SOY7	Cystathione gamma lyase,	5	33	12	5					

A4H9T4	Proteasome alpha 7 subunit	5	29	16	5					Exo
A4HC34	Proteasome subunit alpha type	5	28	25	5	G- (0.67)				Exo
A4H5S5	Elongation factor-1 gamma	5	20	15	5					Exo
A4H6Z3	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	5	20	16	5					
A4HP29	Proteasome subunit beta type	5	20	19	5	G- (0.52)				
A0A088RH85	Uncharacterized protein	5	15	38	5					
A4HDD4	Malic enzyme	5	14	9	5	M (0.63)		M(0.70)		Exo
A4HFB2	Uncharacterized protein	5	14	15	5		Y(0.58)	S(0.95)	NoHelix=1	
A4HNZ5	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	5	13	8	3					
A4H734	Uncharacterized protein	5	13	25	1	G- (0.95) G+ (0.69) M (0.61)				
A4HLU3	Udp-glc 4'-epimerase	5	12	13	4			M(0.51)		Exo
A0A088RU16	Heat shock protein DNAJ,	5	10	14	2	G- (0.74)				Exo
A4H9H6	Uncharacterized protein	5	10	11	2	M (0.67)				
A4HFQ8	Arginyl-tRNA synthetase	5	8	7	5					Exo
E9AIQ3	T-complex protein 1 subunit delta	5	8	7	5			M(0.61)		
A0A088RZE8	Thiol-dependent reductase 1	5	8	15	5	M (0.60)		M(0.52)		
A4HFQ7	Uncharacterized protein	5	8	12	5					
A4HDJ0	IgE-dependent histamine-releasing factor	4	31	21	1					
A4HE26	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	4	29	24	3	G- (0.93) G+ (0.84)				
A4HLC9	Beta-tubulin	4	24	9	0					Exo
A4HCN4	Endoribonuclease L-PSP (Pb5)	4	23	25	4	G- (0.75)				
A4HHC7	Tryparedoxin	4	22	34	4	G- (0.70) M (0.67)				
A4HH52	Cofilin-like protein	4	20	28	4	M (0.73)				Exo
P11718	Probable proton ATPase 1A	4	20	3	3	G+ (0.86)			NoHelix=8	
A4H8B2	Proliferating cell nuclear antigen	4	19	17	4	M (0.77)		M(0.48)		Exo
A4H8J8	Transaldolase	4	16	16	4					Exo
A4HNB5	Uncharacterized protein	4	15	15	4					
A4HDZ2	RNA-binding protein, UPB1	4	14	21	0	G- (0.95) G+ (0.67)				Exo
A4H907	Uncharacterized protein	4	14	42	0	G- (0.94) G+ (0.83)				
A4HAA2	Peptidylprolyl isomerase-like protein	4	13	9	4	G- (0.52)				Exo
A4HEZ3	Prefoldin-like protein	4	13	21	4					Exo
A4H8V8	Receptor-type adenylate cyclase b	4	13	2	4			M(0.46)	NoHelix=2	

A4H537	Splicing factor ptrs1-like protein	4	13	11	4	G- (0.79)		M(0.91)		
E9AIE8	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	4	11	15	4					
A4HLE6	40S ribosomal protein S3	4	11	15	4					Exo
A0A088RNE2	Aminopeptidase,	4	10	9	3	M (0.60)				
A4HGI6	Haloacid dehalogenase-like hydrolase-like protein	4	10	13	4					Exo
A4H3J2	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	4	9	8	4	G- (0.79)				
A0A088S3N5	Dienelactone hydrolase,	4	9	21	3	G- (0.79)				
A4HLJ9	Mitogen activated protein kinase	4	9	12	4					Exo
A4HGX7	Activated protein kinase c receptor (LACK)	4	8	14	0	G- (0.88) G+ (0.61)				Exo^
A4HN57	T-complex protein 1, eta subunit	4	8	7	4					Exo
A4HQL2	T-complex protein 1, theta subunit	4	8	7	3					
A4HBH9	Phosphoglycerate kinase	4	7	8	4				NoHelix=1	Exo
A4H367	Ribosomal protein S7	4	7	18	0	G- (0.57) M (0.74)		M(0.56)		Exo
A4H3X8	Spermidine synthase	4	7	14	4					Exo
A4HD32	Alanine racemase	4	5	24	4	M (0.65)				
A0A088RXU6	Uncharacterized protein	4	4	4	4					
A0A088RRP0	Uncharacterized protein	3	22	23	3	G- (0.52) G+ (0.87)				
A4HE05	Eukaryotic initiation factor 5a	3	21	19	3	G- (0.89) G+ (0.87)				Exo
A4H440	Surface antigen-like protein	3	21	17	0		Y(0.93)	S(0.95)	NoHelix=1	
A4HKH1	Superoxide dismutase	3	20	18	0	G- (0.94) G+ (0.85)				Exo
A0A088SL38	60S ribosomal protein L10a,	3	18	10	1	M (0.71)				Exo
A4HLA1	Uncharacterized protein	3	16	29	3					
A4HEA3	2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	3	14	13	3	M (0.66)				
A4HNY6	Fructose-bisphosphate aldolase	3	14	8	3			M(0.58)		Exo
A4HJJ7	Prostaglandin f2-alpha synthase/D-arabinose dehydrogenase	3	14	15	3					Exo
A4HMA7	Proteasome activator protein pa26	3	14	12	3					
A4H7S1	Uncharacterized protein	3	14	16	0	G- (0.80) M (0.72)				
A4HNP0	Proteasome beta 2 subunit	3	13	11	3	G+ (0.75)			NoHelix=1	Exo

A4HIL9	Uncharacterized protein	3	13	37	2	M (0.78)				
A0A088RTT3	Nucleoside 2-deoxyribosyltransferase,	3	12	30	1					
A4HK65	Uncharacterized protein	3	12	7	2	G- (0.92) G+ (0.74) M (0.68)		M(0.60)		
A4HM77	40S ribosomal protein S3a	3	11	10	2					Exo
A4H3Y8	60S ribosomal protein L10	3	10	18	3	M (0.69)				Exo
A4H4C5	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	3	10	9	3	G- (0.65)				Exo
A4HMK9	60S ribosomal protein L5	3	9	6	2	G- (0.60)				Exo
A4H9Q9	Nonspecific nucleoside hydrolase	3	9	16	3					
A4HCI2	Ca2+-binding EF-hand protein	3	9	19	0					Exo^
Q95VS9	Centrin	3	9	19	0					
Q4QG31	40S ribosomal protein S4	3	8	7	3					Exo
A4H519	40S ribosomal protein S9	3	8	16	0					Exo
A4HFY0	Branched-chain amino acid aminotransferase	3	8	8	3	G- (0.51)		M(0.69)		
A0A088RQ07	La RNA binding protein,	3	8	6	3	G- (0.87)				
A4HQJ7	Prolyl oligopeptidase	3	8	5	3	G- (0.65) G+ (0.77) M (0.61)				
A4H5R5	Uncharacterized protein	3	8	8	3					
A4HAD7	Uncharacterized protein	3	8	5	1	G- (0.90)				
A4HI66	Importin subunit alpha	3	7	8	3	M (0.68)				Exo
A4HHL6	Rab-GDP dissociation inhibitor	3	7	8	3					Exo
A4HJ88	Biotin/lipoate protein ligase-like protein	3	6	13	3					
A4H7P6	Immunodominant antigen	3	6	4	3					
A4HCV5	Uncharacterized protein	3	6	7	3		Y(0.51)	S(0.93)	NoHelix=1	
E9AV10	Uncharacterized protein	3	6	4	1	M (0.88)				
A0A088RL85	Chaperonin TCP20,	3	5	6	3					Exo^
A4HJY8	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase	3	5	10	3					
A4H7H4	Inosine-guanine nucleoside hydrolase	3	5	5	2	M (0.75)				
A4HF40	Uncharacterized protein	3	5	3	3					
A4H873	60S ribosomal protein L6	3	4	21	0	G- (0.95) M (0.63)		M(0.7))		Exo
A4HQL6	Protein disulfide-isomerase	3	3	5	3		Y(0.85)	S(0.97)		Exo^
A4HHD6	Uncharacterized protein	3	3	5	3					
A4HMZ8	Uncharacterized protein	3	3	15	3	G- (0.61)		M(0.41)		
A4H951	META domain containing protein	3	3	5	2					
A0A088RI51	20S proteasome beta 6 subunit,	2	11	11	2	G- (0.87) G+				Exo

						(0.72)				
Q8MU50	Thiol-specific antioxidant protein	2	11	11	0	M (0.61)				
A4HDT2	60S ribosomal protein L12	2	10	13	0	G- (0.88) M (0.86)				Exo
O44010	60S acidic ribosomal protein P2	2	9	20	2					
A4HK20	ATP-dependent RNA helicase	2	9	3	2	G- (0.79)				
A0A088RPK9	20s proteasome beta 7 subunit,	2	8	5	2					
A4H7E8	Ubiquitin-conjugating enzyme-like protein	2	8	17	2	G- (0.81) M (0.89)				Exo^
A4HMQ9	Aminopeptidase P	2	7	4	2			M(0.47)		Exo
A4HNL3	Histone H4	2	7	11	0	M (0.89)		M(0.69)		Exo
A4HCQ1	NADP-dependent alcohol dehydrogenase	2	7	5	2					Exo
A4HPP5	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	2	7	25	1	G- (0.93) G+ (0.78) M (0.65)				Exo^
A4H8B1	Glutaminyl-tRNA synthetase	2	6	3	2			M(0.64)		Exo
A4HLW5	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	2	6	5	2					Exo
A4HA02	Nucleosome assembly protein	2	6	3	2					Exo
A4HI52	p22 protein	2	6	10	2	G- (0.73)				
E9AIL2	Phosphatase-like protein	2	6	8	2	G- (0.95) G+ (0.87) M (0.75)				
A4HQC5	Uncharacterized protein	2	6	3	2	G- (0.60)				
A4H9C6	Uncharacterized protein	2	6	4	0	G- (0.93) G+ (0.75)				
Q4Q9A5	40S ribosomal protein S16	2	5	7	2	G- (0.53) M (0.68)				Exo
A4H6M6	Pyruvate phosphate dikinase	2	5	2	2					
A4HFK0	Small GTP-binding protein Rab1	2	5	12	2	G- (0.57) G+ (0.68)				Exo^
A4HC80	Uncharacterized protein	2	5	3	2	G- (0.52)				
A4H9W3	40S ribosomal protein S2	2	4	5	0	M (0.64)				Exo
A4HQ28	40S ribosomal protein SA	2	4	8	2					Exo
A4H745	60S ribosomal protein L18	2	4	8	0	G- (0.56)				Exo
A4H8H9	Aspartate carbamoyltransferase	2	4	6	2					
A4H8R0	Cytochrome c	2	4	24	0	G- (0.92)				Exo
A4HCI3	I/6 autoantigen-like protein	2	4	10	2					
A4HGN5	Replication factor A, 51kDa subunit	2	4	5	2	G- (0.73)				
A4H7T3	Uncharacterized protein	2	4	7	2					
A4H491	Uncharacterized protein	2	4	13	2					

A4H3R3	40S ribosomal protein S19 protein	2	3	11	0	G- (0.91) M (0.73)				Exo
E9ATZ6	isoleucyl-tRNA synthetase	2	3	1	2				NoHelix=2	Exo
A0A088S416	PAB1-binding protein,	2	3	7	2	G- (0.88) G+ (0.92)				Exo
A4HLU0	Uncharacterized protein	2	3	2	2					
A4HHN3	Uncharacterized protein	2	3	9	1	M (0.63)				
A0A088SF64	Uncharacterized protein	2	3	6	1					
A4HKK5	Uncharacterized protein	2	3	2	2	M (0.67)				
A0A088RTU7	Amino acid permease,	2	2	3	2	G+ (0.96) M (0.63)		M(0.62)	NoHelix=10	
A0A088S3S2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8,	2	2	3	2					Exo
A4HCM4	GDP-mannose pyrophosphorylase	2	2	7	2	M (0.62)		M(0.45)		Exo
A4HFV1	Glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	2	2	3	1					Exo^
A4HPQ1	Glycyl tRNA synthetase	2	2	5	0					Exo
A4HE17	Prefoldin subunit 4	2	2	16	0					Exo
Q4Q504	Ribosomal protein L27	2	2	12	2	G- (0.57) M (0.61)				Exo
A4HC04	RNA helicase	2	2	5	2					Exo^
A4H5F0	Stress-induced protein sti1	2	2	4	2					
A4HHA6	Uncharacterized protein	2	2	5	2					
E9B6M3	Uncharacterized protein	2	2	10	2	G- (0.50) M (0.69)				
A4H5I7	Uncharacterized protein	2	2	3	2	M (0.66)				
A4HIR8	UV excision repair RAD23-like protein	2	2	4	2	G- (0.92)				
A4HIP3	Uncharacterized protein	1	7	3	1	G- (0.94)				
A4HK69	60S ribosomal protein L18a	1	6	7	1	G- (0.61) M (0.63)				Exo
A4H673	Nuclear transport factor 2	1	6	10	1	G- (0.61)				Exo
A4HK56	RNA binding protein	1	5	8	1	G- (0.96)				
A4H5B4	Small ubiquitin protein	1	5	10	1	G- (0.92) G+ (0.66) M (0.84)				Exo^
A4HPG1	Succinyl-CoA ligase subunit beta	1	5	3	1			M(0.71)		Exo
A4HI30	4-methyl-5(Beta-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate synthesis protein	1	4	6	1	M (0.66)				
E9AI48	60S acidic ribosomal protein	1	4	10	1	G- (0.59) G+ (0.79)		S(0.71)	NoHelix=1	

A4H500	60S ribosomal protein L7a	1	4	5	1	G- (0.69)				Exo
A4HCH8	Farnesyl pyrophosphate synthase	1	4	3	1					Exo
A4HI39	Uncharacterized protein	1	4	8	1	M (0.72)				
A0A088SHU9	Uncharacterized protein	1	4	3	1	G- (0.94) G+ (0.78)			NoHelix=1	
A4H776	Uncharacterized protein	1	4	2	1	G- (0.92) G+ (0.93)		M(0.57)		
A4H414	Uncharacterized protein	1	4	4	1	G- (0.65) G+ (0.87)				
A0A088RIT1	Qc-SNARE protein,	1	4	7	1				NoHelix=1	
A4H570	Vesicle-associated membrane protein	1	4	7	1				NoHelix=1	Exo^
A4HMM1	40S ribosomal protein S6	1	3	4	1	G- (0.54) M (0.72)				Exo
A4HGT5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	1	3	3	1			S(0.61)		Exo
A4HAG4	Importin beta-1 subunit	1	3	1	1	M (0.73)				Exo
O43968	Kinetoplastid membrane protein-11	1	3	10	1	G- (0.78) M (0.81)				
A4HPC5	Membrane-bound acid phosphatase 2	1	3	2	1		Y(0.88)	S(0.92)	NoHelix=2	
A4HNJ0	p21 antigen protein	1	3	5	1					
A4H9N1	Prolyl-tRNA synthetase	1	3	2	1					Exo
E9AIL3	Ribosomal protein S11 homolog	1	3	5	1	G- (0.70) M (0.78)				Exo
A4HFW1	Trypanothione synthetase	1	3	2	1					Exo
A4H817	Uncharacterized protein	1	3	1	1					
A4HH33	Uncharacterized protein	1	3	3	1	G- (0.93)				
A4H605	Uncharacterized protein	1	3	2	1	G+ (0.94) M (0.81)			NoHelix=8	
A4HJC7	Uncharacterized protein	1	3	1	1		Y(0.57)	S(0.93)	NoHelix=1	
A4HEB5	Uncharacterized protein	1	3	7	1	M (0.67)				
A4HHP5	60S ribosomal protein L13	1	2	5	1	G- (0.90)				Exo
A4HAJ9	60S ribosomal protein L13a	1	2	8	1	G- (0.57) M (0.6)				Exo
A4HML2	60S Ribosomal protein L36	1	2	13	1	M (0.64)				Exo
A4HI44	Adenosine kinase	1	2	3	1					Exo
A4HB47	Amastin-like protein	1	2	5	1	G+ (0.94)		S(0.97)	NoHelix=4	
A4HET8	Asparagine synthetase a	1	2	2	1					Exo
A4H4S0	Deoxyribose-phosphate aldolase	1	2	4	1					Exo
E9AI53	Dihydroorotate dehydrogenase	1	2	5	1	M (0.6)				

A4HNN3	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	1	2	2	1	M (0.64)				Exo
A4HNU9	Eukaryotic translation initiation factor 6	1	2	4	1					Exo
A4H8L6	Flagellar calcium-binding protein	1	2	6	1					
A4HMU1	Galactokinase-like protein	1	2	3	1	M (0.69)				Exo
A4HAP2	NLI-interacting factor	1	2	3	1	M (0.89)		M(0.72)		
A4H7C7	Programmed cell death 6 protein-like protein	1	2	4	1	G- (0.95) G+ (0.81) M (0.87)				Exo
A4HJX1	Uncharacterized protein	1	2	3	1		Y(0.58)	S(0.96)	NoHelix=2	
A4HDP1	Uncharacterized protein	1	2	11	1	G- (0.94) G+ (0.78)				
A4HN04	Uncharacterized protein	1	2	1	1			M(0.60)		
A4HB74	Uncharacterized protein	1	2	4	1	G- (0.66)				
A4HA65	Uncharacterized protein	1	2	3	1					
Q4QCS4	Calpain-like cysteine peptidase, Clan CA, family C2	1	2	7	1					Exo
E9AIH7	Uncharacterized protein	1	2	7	1	G+ (0.50)				

^a SecretomeP 2.0, servidor usado para predição de secreção de proteínas por vias alternativas. As seqüências de proteínas foram analisadas usando o algoritmo para bactérias Gram-positivas (G+) e Gram-negativas (G-) e o algoritmo para mamíferos (M). O número entre parênteses indica o valor do score preditivo.

^bSignal P, servidor usado para predição de peptídeo sinal, indicativo de secreção por via clássica. Y: proteína com peptídeo sinal N-terminal; o número entre parênteses indica o valor do score preditivo

^cTargetP, servidor para predição de localização celular. S e M fazem referência à predição de peptídeo sinal N-terminal e localização mitocondrial, respectivamente. Os números entre parênteses correspondem ao NN-score para cada predição.

^dTMHMM, servidor para predição de hélices transmembrana,

^eExoCarta, base de dados que reporta proteínas secretadas por exossomos. Exo indica as proteínas secretadas por exossomos, determinado por similaridade de seqüência com as proteínas de diversos modelos biológicos. Exo[^] faz referência a proteínas que poderiam ter similaridade com proteínas do banco de dados da ExoCarta.

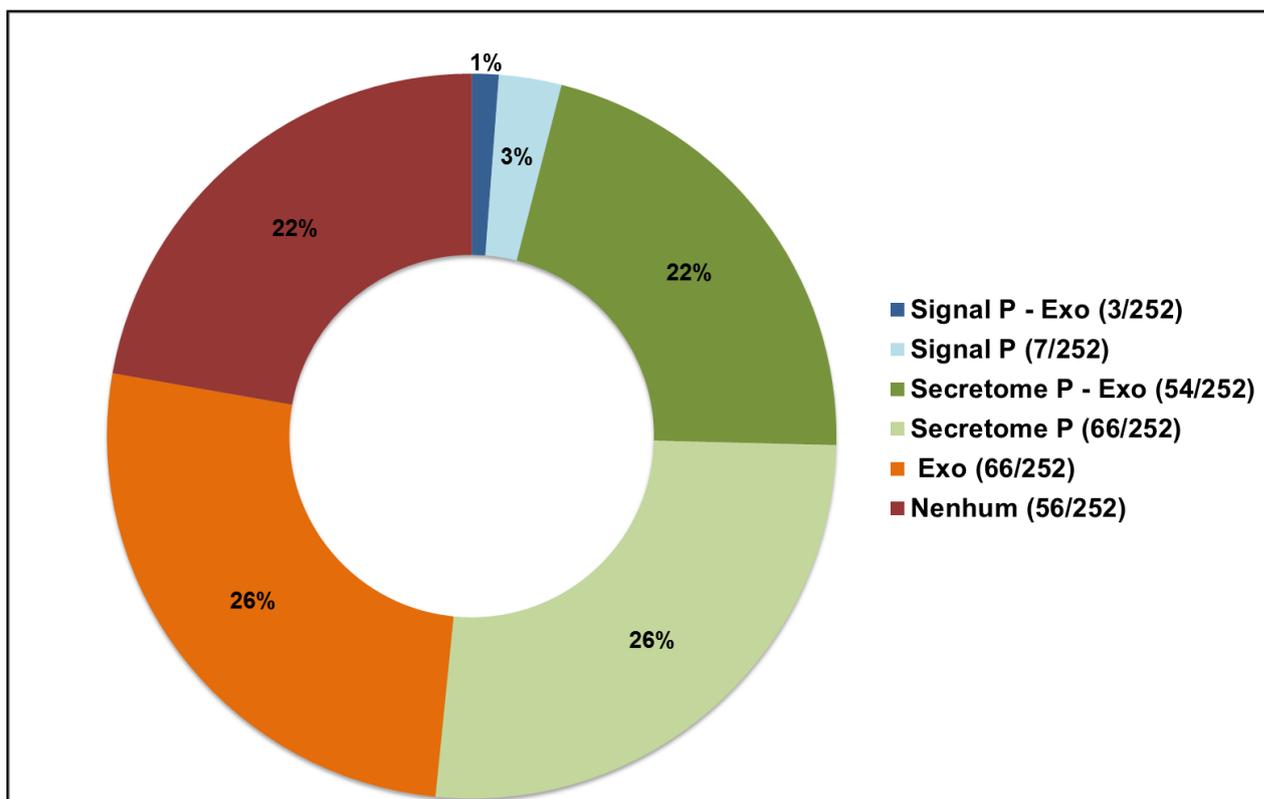


Figura 5.3. Predição de via de secreção para as proteínas identificadas no secretoma de *L. (V.) braziliensis*. Proteínas com predição pra secreção via classica (Signal P), via alternativa (Secretome P), via alternativa-exossomal (SecretomaP-exo), via exosomal exclusiva (Exo) e sem predição.

Das 252 proteínas identificadas, 56 (22%) correspondem a proteínas ainda não caracterizadas. Para cada uma das 56 proteínas não caracterizadas, foi feita uma predição de domínios funcionais utilizando o servidor Pfam 27.0 (<http://pfam.xfam.org/>) (175) e encontramos que foi possível predizer pelo menos um domínio funcional para alguma região da proteína em ~45% dos casos (25/56). Entre esses domínios destacamos proteínas de choque térmico, tioredoxina, fosfatases, entre outros (Tabela 5.2). O resultado da predição de domínios é apresentado na tabela 5.2.

Tabela 5.2. Predição de domínios funcionais para as proteínas não caracterizadas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. As proteínas identificadas na secreção de *L. (V.) braziliensis* como “proteínas não caracterizadas” foram submetidas a uma análise de predição de domínios funcionais usando o servidor Pfam 27.0.

Código Uniprot	Domínio 1 Pfam	Domínio 2 Pfam
A0A088RXU6	Staphylococcal nuclease homologue (SNase)	TUDOR
A4H5R5	Metal binding residues (UPF0160)	
A4H605	Amastin	
A4H734	Alba	
A4H7H9	Small redox proteins (Thioredoxin_8)	
A4H7K5	he N-terminus of nuclear distribution gene C homolog (NUDC) proteins (Nudc_N)	CS domain is a binding module for HSP90
A4H7S1	p25-alpha	
A4H7T3	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase, NAD binding domain (PF02826)	
A4H907	The Acyl-CoA-binding protein (ACBP)	
A4H9C6	Activator of Hsp90 ATPase, N-terminal (Aha1_N)	Activator of Hsp90 ATPase homolog 1-like protein (AHSA1)
A4H9H6	The HEAT repeat domain (HEAT_2)	
A4HAD7	DUF families (DUF1935)	
A4HAX5	Alba	
A4HB74	The ankyrin repeat domains (Ank_2)	
A4HE10	Protein phosphatase 2C (PP2C)	
A4HFQ7	The K Homology (KH) domain binds RNA (KH_1)	
A4HH33	Tetratricopeptide repeat (TPR_11)	
A4HHA6	Family of potential enzymes (DinB_2)	Formylglycine-generating sulfatase enzyme (FGE-sulfatase)
A4HHD6	HSP70	
A4HI39	Prefoldin_2	
A4HM16	Opioid growth factor receptor (OGFr_III)	
A4HNB5	CS domain is a binding module for HSP90	
A4HQC5	Middle domain of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G)(MIF4G)	
E9AIH7	DUF families (DUF1935)	
E9B6M3	Replication factor A (Rep_fac-A_3)	

5.3 As proteínas secretadas por *L. (V.) braziliensis* estão envolvidas principalmente em atividades catalíticas

As 252 proteínas identificadas foram agrupadas nas principais categorias ontológicas de processo biológico, função molecular e componente celular usando o módulo GOEx do PatternLab. Foi possível classificar 71% (180/252) das proteínas identificadas em alguma das três categorias ontológicas, ao passo que ~29%

(72/252) das proteínas não tiveram nenhuma classificação associada (Figura 5.4). Foi possível determinar algum processo biológico para ~43% (107/252) das proteínas e dentre estas, 34% participariam em processos celulares e 34% em processos metabólicos (Figura 5.5A). A categoria de componente celular agrupa 43% das proteínas identificadas como componentes citoplasmáticos celulares e 25% como parte de complexos macromoleculares (Figura 5.5B). Por fim, a categoria de função molecular indica que a maioria das proteínas agrupa-se nas subcategorias associadas à atividade catalítica (44%) e/ou ligação (40%) (Figura 5.5C).

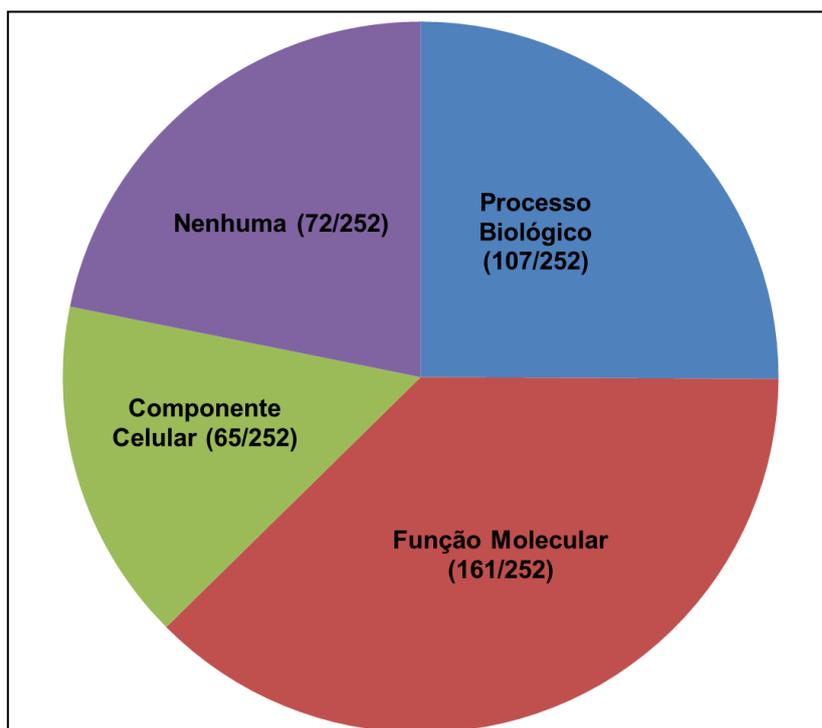
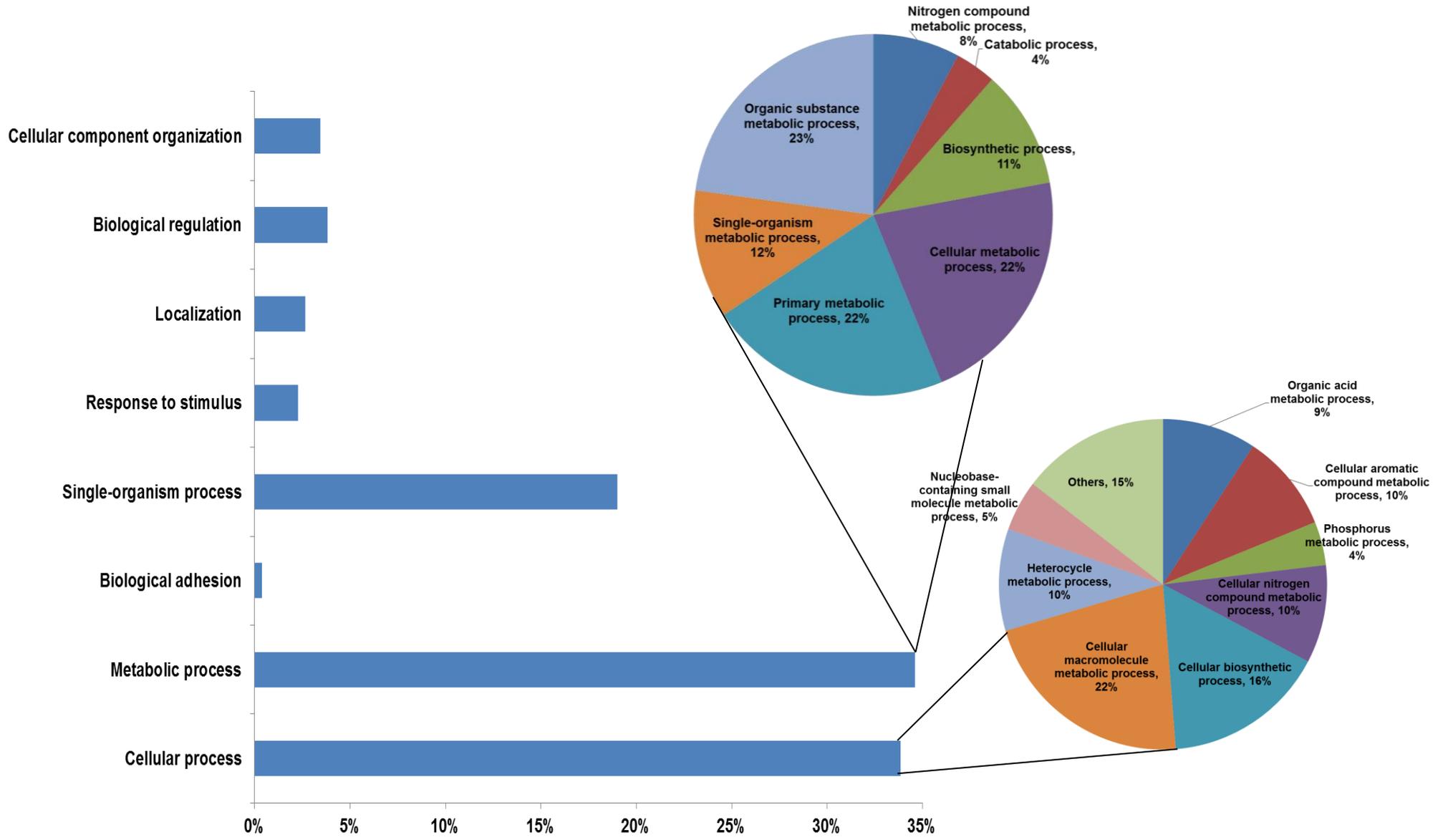
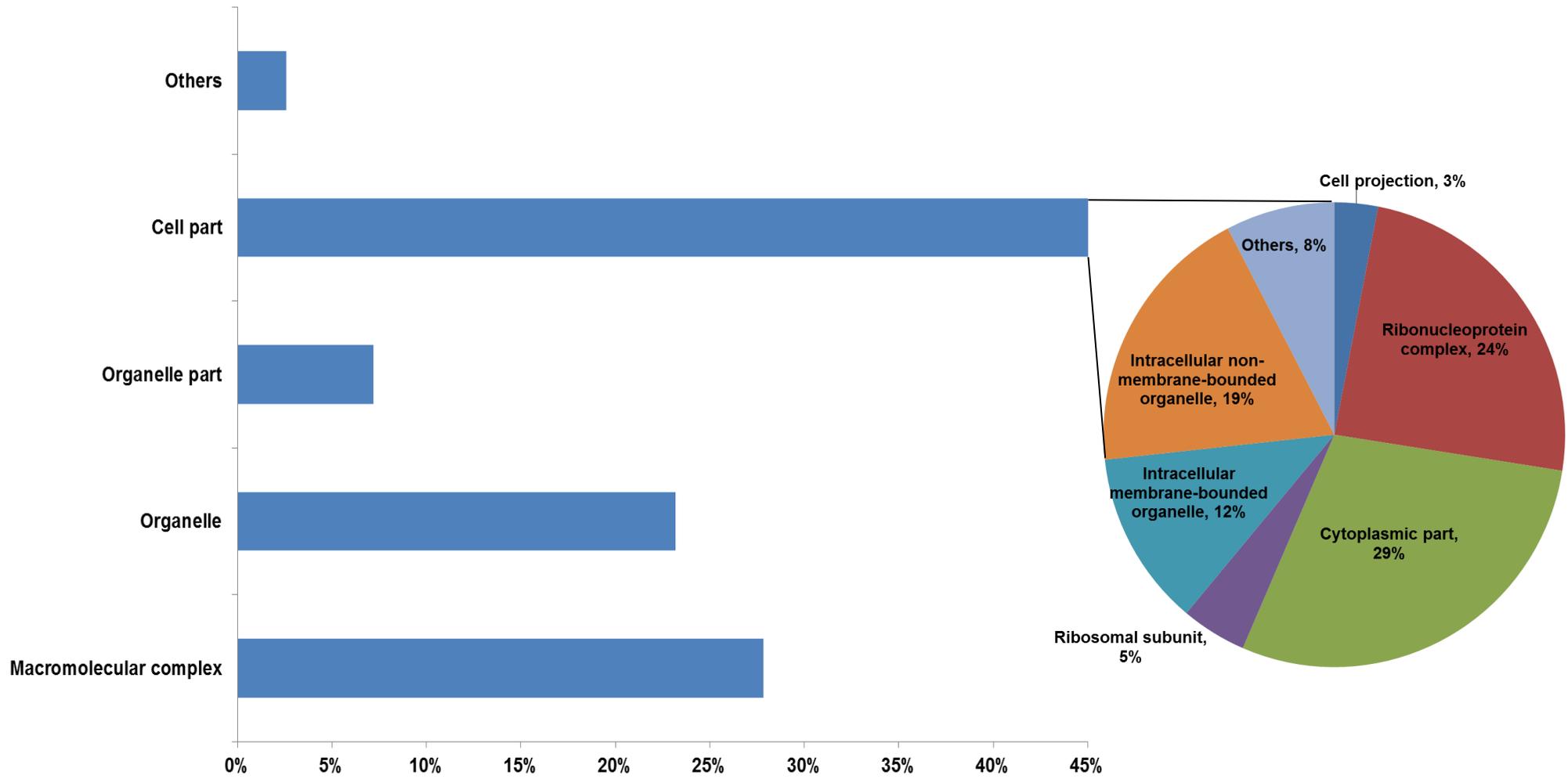


Figura 5.4. Distribuição da classificação ontológica das proteínas secretadas por cepas de *L. (V.) braziliensis*. Proteínas secretadas por promastigotas das duas cepas foram classificadas nas três principais categorias ontológicas usando o módulo GOEx do PatternLab.

A.



B.



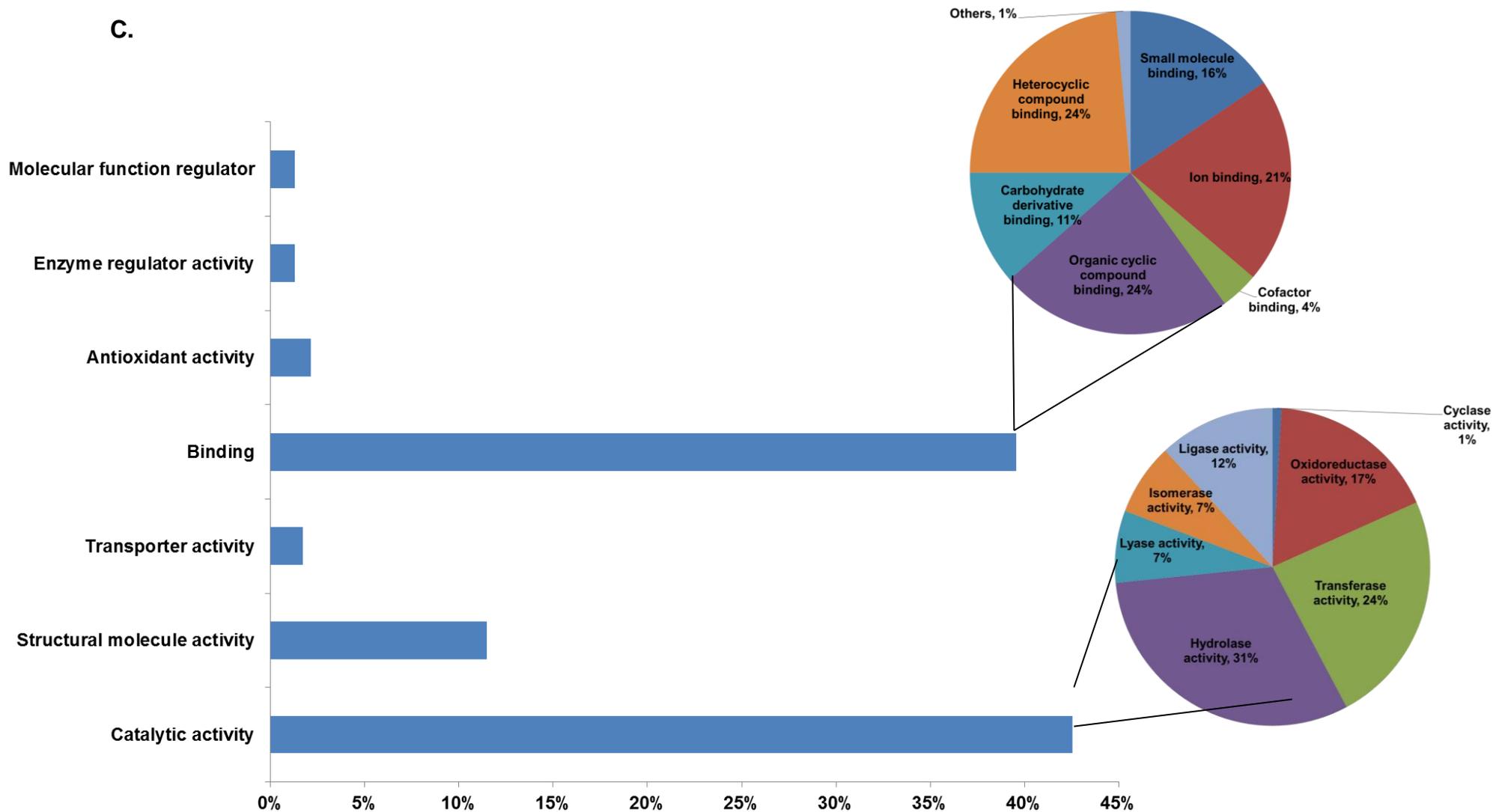


Figura 5.5. Classificação ontológica para as proteínas identificadas na secreção de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. As proteínas foram classificadas em três categorias, (A) processo biológico, (B) componente celular e (C) Função molecular.

Dentre a classificação ontológica feita para as proteínas identificadas, foi possível focar em algumas categorias como, por exemplo, resposta ao estresse, degradação proteica, síntese proteica, entre outras, as quais resultam interessantes para o estudo das primeiras interações do parasito com as células hospedeiras. Desta forma, 94 proteínas foram classificadas em seis categorias diferentes: (i) resposta ao estresse e enovelamento de proteínas, (ii) proteínas associadas a metabolismo de carboidratos, (iii) aminoácidos e (iv) nucleotídeos, (v) proteínas envolvidas na degradação proteica e (vi) proteínas envolvidas na síntese proteica. Na resposta ao estresse e a dobramento de proteínas, por exemplo, foram encontradas 18 proteínas entre as quais estão cinco proteínas de choque térmico incluindo *Heat shock 70-related protein 1* (A4HII0) e *Heat-shock protein hsp70* (A4HGY1) (Tabela 5.3). No caso de proteínas envolvidas na degradação proteica foram identificadas 17 incluindo peptidases reconhecidas por seu papel na virulência, como a GP63. De igual modo foram identificadas 35 proteínas associadas à tradução e síntese de proteínas, a maioria das quais é secretada por via exossomal.

Tabela 5.3. Proteínas identificadas na secreção de *L. (V.) braziliensis* e classificadas em processos relevantes na interação parasito-hospedeiro.

Uniprot Código	Nome	Número de Peptídeos
<i>Proteínas envolvidas na resposta ao estresse e pregamento de proteínas</i>		
A0A088RUF5	Glucose-regulated protein 78,	7
A4HII0	Heat shock 70-related protein 1,mitochondrial	12
A4H9P0	Heat shock protein	10
A4HL70	Heat shock protein 83-1	18
A0A088RU16	Heat shock protein DNAJ,	5
A4HGY1	Heat-shock protein hsp70	21
A4HKX2	T-complex protein 1 subunit alpha	6
E9AIQ3	T-complex protein 1 subunit delta	5
E9AWE0	T-complex protein 1 subunit gamma	7
A4HN57	T-complex protein 1, eta subunit	4
A4HQL2	T-complex protein 1, theta subunit	4
A4H879	Tryparedoxin peroxidase	6
A4HKH1	Superoxide dismutase	3
E9JUH4	Trypanothione reductase	8
A4HHC7	Tryparedoxin	4
A4HFW1	Trypanothione synthetase	1
A4HCL7	Peroxidoxin	7
A0A088RZE8	Thiol-dependent reductase 1	5
<i>Proteínas envolvidas na degradação protéica</i>		
A0A088RI51	20S proteasome beta 6 subunit,	2
A4H6I8	Aminopectidase	11

A4HMQ9	Aminopeptidase P	2
A4HFH6	Calpain-like cysteine peptidase	25
Q4QCS4	Calpain-like cysteine peptidase, Clan CA, family C2	1
A4H716	Carboxypeptidase	11
A0A088RIB2	Dipeptidyl-peptidase III,	17
A4H638	GP63, leishmanolysin	15
A4H5Q8	Oligopeptidase b	8
A4HJV3	Phosphoglycan beta 1,3 galactosyltransferase 5	6
A4HQJ7	Prolyl oligopeptidase	3
A4HMA7	Proteasome activator protein pa26	3
A4H9T4	Proteasome alpha 7 subunit	5
A4HNP0	Proteasome beta 2 subunit	3
A4HC34	Proteasome subunit alpha type	5
A4HP29	Proteasome subunit beta type	5
A4HF12	Thimet oligopeptidase	7
<u><i>Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos</i></u>		
A4HQI8	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	6
A4H7T6	Enolase	9
A4HNY6	Fructose-bisphosphate aldolase	3
A4HMU1	Galactokinase-like protein	1
A4H643	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	7
A4HFV1	Glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	2
A7UFI6	Malate dehydrogenase	11
A4HCQ1	NADP-dependent alcohol dehydrogenase	2
A4HBH9	Phosphoglycerate kinase	4
A0A088S299	Phosphomannomutase,	6
A4HM36	Pyruvate kinase	6
A4H6M6	Pyruvate phosphate dikinase	2
A4H8J8	Transaldolase	4
A0A088SAQ9	Triosephosphate isomerase	6
A4HLU3	Udp-glc 4'-epimerase	5
<u><i>Metabolismo de nucleotídeos fosfato</i></u>		
A4HQG9	Histidine secretory acid phosphatase	6
A4H9Q9	Nonspecific nucleoside hydrolase	3
A0A088RTT3	Nucleoside 2-deoxyribosyltransferase,	3
A4HKT7	Nucleoside diphosphate kinase	8
A4H4C5	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	3
<u><i>Metabolismo de aminoácidos</i></u>		
A4HPQ8	Adenosylhomocysteinase	16
A4HMB3	Aspartate aminotransferase	10
A0A088S0Y7	Cystathione gamma lyase,	5
A4H3J2	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	4
<u><i>Proteínas envolvidas na tradução e síntese protéica</i></u>		
A4H746	40S ribosomal protein S12	7
Q4Q9A5	40S ribosomal protein S16	2
A4H3R3	40S ribosomal protein S19 protein	2
A4H9W3	40S ribosomal protein S2	2
A4HLE6	40S ribosomal protein S3	4
A4HM77	40S ribosomal protein S3a	3
Q4QG31	40S ribosomal protein S4	3
A4HMM1	40S ribosomal protein S6	1

A4H519	40S ribosomal protein S9	3
A4HQ28	40S ribosomal protein SA	2
E9AI48	60S acidic ribosomal protein	1
O44010	60S acidic ribosomal protein P2	2
A4H3Y8	60S ribosomal protein L10	3
A0A088SL38	60S ribosomal protein L10a,	3
A4HDT2	60S ribosomal protein L12	2
A4HHP5	60S ribosomal protein L13	1
A4HAJ9	60S ribosomal protein L13a	1
A4H745	60S ribosomal protein L18	2
A4HK69	60S ribosomal protein L18a	1
A4HML2	60S Ribosomal protein L36	1
A4HMK9	60S ribosomal protein L5	3
A4H873	60S ribosomal protein L6	3
A4H500	60S ribosomal protein L7a	1
A4HFQ8	Arginyl-tRNA synthetase	5
A4H8V4	Elongation factor 1-alpha	6
Q2HZY7	Elongation factor 2	18
A4H5S5	Elongation factor-1 gamma	5
A4HCN4	Endoribonuclease L-PSP (Pb5)	4
A4HE05	Eukaryotic initiation factor 5a	3
A0A088S3S2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8,	2
A4HGT5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	1
A4HNN3	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	1
A4HNU9	Eukaryotic translation initiation factor 6	1
Q25225	Probable eukaryotic initiation factor 4A	11
A4HAJ7	Translation elongation factor 1-beta	6

5.4 Moonlighting proteins: proteínas secretadas por *L. (V.) braziliensis* podem ter múltiplas funções diferentes no espaço intracelular e extracelular

Muitas das proteínas identificadas no secretoma de *L. (V.) braziliensis* apresentam uma função canônica no ambiente intracelular e, portanto, sua presença no meio de secreção é intrigante. Com o objetivo de fazer uma primeira aproximação às possíveis funções destas proteínas no espaço extracelular e para determinar se poderiam estar envolvidas em mais de uma tarefa, foi feita uma comparação com o banco de dados disponível para proteínas reconhecidas como multitarefa (*Moonlighting proteins*) para outros organismos. Foram aceitas proteínas cuja similaridade obteve score superior a 60 e cobertura maior que 60%. Encontramos que 22/252 proteínas identificadas têm similaridade com algumas das 288 proteínas disponíveis no banco de dados de proteínas multitarefa (Tabela 5.4). Algumas das proteínas identificadas no secretoma de *L. (V.) braziliensis* têm similaridade com

mais de uma proteína presente no banco de dados (Tabela 5.4) e, para estas tem sido associada mais de uma função.

Tabela 5.4. Proteínas identificadas no secretoma de *L. (V.) braziliensis* que apresentam funções múltiplas. As proteínas com função múltipla foram reconhecidas por similaridade com proteínas depositadas no banco de dados de proteínas *moonlight*.

Cod <i>Leishmania</i>	Nome	Via de secreção	Função canônica	Organismo (Cod. Uniprot)	Blast cobertura	Blast score	Função <i>Moonlighting</i> *
A4HCL7	Peroxidoxin	Alternativa	1-Cys Peroxiredoxin (peroxidase)	<i>Homo sapiens</i> (P30041)	96%	241	Phospholipase aiPLA2
A4H9F9	Aconitate hydratase		Catalyses the stereo-specific isomerization of citrate to isocitrate via cis-aconitate (TCA cycle)	<i>Homo sapiens</i> (Q71UF1)	87%	193	Doom homeostasis / IREBP: Iron-responsive element-binding protein (cytosol), mtDNA maintenance (mitochondrion)
				<i>Homo sapiens</i> (P21399)	87%	193	mRNA binding protein
A4HII0	Heat shock 70-related protein 1, mitochondrial	Exo	Chaperone: Prevents misfolding and promotes the refolding and proper assembly of unfolded polypeptides generated under stress conditions	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (P0A5B9)	92%	595	Stimulates CD8 lymphocyte chemokine production - Stimulates monocyte chemokine synthesis and dendritic cell maturation by binding CD40 - Binds to HIV coreceptor CCR5 - Competes with HIV for binding to CCR5 - Plasminogen binding protein
A4H7T6	Enolase	Exo	Conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate (Glycolysis)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (P00924)	96%	478	Homotypic vacuole fusion, Mitochondrial tRNA import (Assists mitochondrial import of tRNAsLys / DNA binding / Lens crystallin protein in turtles)
				<i>Rattus norvegicus</i> (& <i>Homo sapiens</i>) (P07323)	96%	478	It has neurotrophic and neuroprotective effects on rather a broad spectrum of neurons in the central nervous system (promotes cell survival)
				<i>Mycoplasma fermentans</i> (E8UH16)	96%	478	Plasminogen binding
A4HM36	Pyruvate kinase	Exo	Converts phosphoenolpyruvate (PEP) to pyruvate (glycolysis)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (D2BRB9)	91%	297	<i>L. lactis</i> cell surface protein that binds to yeast mannan
A4HCL7	Peroxidoxin	Alternativa	Cytoplasmic peroxiredoxin (Peroxidase)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (P34760)	96%	241	Chaperon & Phospholipase aiPLA2
A4HKH1	Superoxide dismutase	Alternativa-Exo	Destroys radicals which are normally produced within the cells and which are toxic to biological systems	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (G2UMZ1)	91%	132	Adhesin, binding to a number of host moonlighting proteins such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

							and aldolase
A4HAG4	Importin beta-1 subunit	Alternativa-Exo	Govern selective transport of proteins into the nucleus	<i>Cryptosporidium hominis</i> (Q5CIV6)	99%	255	It also selectively targets the motor protein Kif17 to primary cilia
A4HE26	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Alternativa	Intracellular function: Peptidyl-prolyl isomerase activity and a molecular chaperone found in the cytoplasm	<i>Homo sapiens</i> (P62937)	98%	237	Extracellular function (non-classical secretion routes): A proinflammatory cytokine (exosomes)
A4HBH9	Phosphoglycerate kinase	Exo	It converts 3-phospho-D-glycerate to 3-phospho-D-glyceroyl phosphate (glycolysis)	<i>Homo sapiens</i> (P00558)	99%	336	Plasmin reductase
A4H8R0	Cytochrome c	Alternativa-Exo	It transfers electrons between Complexes III (Coenzyme Q - Cyt C reductase) and IV (Cyt C oxidase). Electron transport chain	Various (<i>Homo sapiens</i>) (P99999)	94%	124	Controlling apoptosis
A4HKX6	Dihydrolipoyl dehydrogenase		Lipoamide dehydrogenase is a component of the glycine cleavage system as well as of the alpha-ketoacid dehydrogenase complexes	<i>Homo sapiens</i> (P09622)	91%	469	Protease
A4HLJ9	Mitogen activated protein kinase	Exo	Mitogen-activated protein kinase 1 (MAP kinase)	<i>Homo sapiens</i> (P28482)	96%	303	Transcriptional repressor
A4H8V4	Elongation factor 1-alpha	Alternativa-Exo	Protein synthesis (GTP-dependent binding of amino-acyl-tRNA at the ribosome acceptor site)	<i>Carrot (Daucus carota)</i> (P34823)	98%	730	Cytoskeleton structure regulation
A4HMK9	60S ribosomal protein L5	Alternativa-Exo	Required for rRNA maturation and formation of the 60S ribosomal subunits. This protein binds 5S RNA	<i>Homo sapiens</i> (P46777)	91%	300	Malignant transformation (forms a complex with Mdm2 & p53, this complex can bind 5S RNA)
A4H9F9	Aconitate hydratase		Responsible for the dehydration of cis-homoaconitate to homoisocitric acid.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (P49367)	87%	193	Mitochondrial DNA stability
A4H3R3	40S ribosomal protein S19 protein	Alternativa-Exo	Ribosomal protein	<i>Ascaris lumbricoides</i> (P24494)	93%	79	Regulation of development (required for chromatin condensation)
A4H9W3	40S ribosomal protein S2	Alternativa-Exo		<i>Drosophila melanogaster</i> (P31009)	83%	293	Regulation of development (plays a role in oogenesis and is necessary for maturation of the egg follicle)
A4HLE6	40S ribosomal protein S3	Exo		<i>Homo sapiens</i> (P23396)	86%	268	DNA repair
Q4QG31	40S ribosomal protein S4	Exo		<i>Homo sapiens</i> (P22090)	97%	273	Regulation of development (Turner syndrome: female gonadal insufficiency)
O44010	60S acidic ribosomal protein P2			<i>Rattus norvegicus</i> (P02401)	100%	60	P2 was isolated from the liver as an iron-binding protein that is responsible for distributing iron intracellularly

A4HMK9	60S ribosomal protein L5	Alternativa-Exo		<i>Rattus norvegicus (P09895)</i>	91%	300	L5-5S rRNA complexes stimulate aminoacyl-tRNA synthetases
			Ribosomal protein, component of the large ribosomal subunit	<i>Homo sapiens (P46777)</i>	91%	300	Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation
A4H4S0	Deoxyribose-phosphate aldolase	Exo	Splits the fructose 1,6-bisphosphate, into dihydroxyacetone phosphate & glyceraldehyde 3-phosphate (Glycolysis)	<i>Mycobacterium avium (F7P6E1)</i>	92%	132	M. avium adhesins bind to intestinal mucus aldolase, conceivably facilitating intestinal colonization of the organism
A4H879	Tryparedoxin peroxidase		Thiol-specific antioxidant-likeprotein	<i>Candida albicans (Q9Y7F0)</i>	96%	234	Chaperone / has been found in a genetic screen to be involved in mutation suppression and to strongly suppress chromosomal rearrangements / cell wall biogenesis

*Função depositada na base de dados de acordo com evidencia experimental.

5.5 Cepas de *L. (V.) braziliensis* associadas a distintas manifestações clínicas apresentam diferenças significativas na abundância de proteínas secretadas

As mudanças na abundância de proteínas secretadas entre as cepas foram calculadas a partir da comparação das intensidades de íons repórteres do iTRAQ. Os valores totais de intensidade foram normalizados no módulo Quant-Isobaric analyzer até obter a normalização de cada canal em cada arquivo .RAW. Na Figura 5.6 apresenta-se um exemplo representativo da normalização feita para os dados antes de fazer a quantificação dos peptídeos. Após a normalização da intensidade dos marcadores foi possível observar que a abundância de 26/252 proteínas identificadas (~10%) é diferente entre as cepas. Destas, a abundância relativa de 13 proteínas (5% do total de proteínas identificadas, 13/252) foi aumentada na cepa disseminada em comparação com a cepa cutânea, ao passo que a abundância relativa de outras 13 proteínas (5%, 13/252) foi diminuída (Tabela 5.5).

Interessantemente, quatro proteínas (A4HKX6, O44010, A4H8V4 e A4HLE6) que foram encontradas diferencialmente abundantes na secreção de *L. (V.) braziliensis* (Tabela 5.5) apresentaram similaridade com proteínas multitarefas descritas em outros organismos (Tabela 5.4). Duas delas foram encontradas aumentadas na secreção da cepa cutânea localizada (*Dihydrolipoyl dehydrogenase* - A4HKX6 e *60S acidic ribosomal protein P2* - O44010) e as outras duas aumentadas na secreção da cepa cutânea disseminada (*Elongation factor 1-alpha* - A4H8V4 e *40S ribosomal protein S3* - A4HLE6).

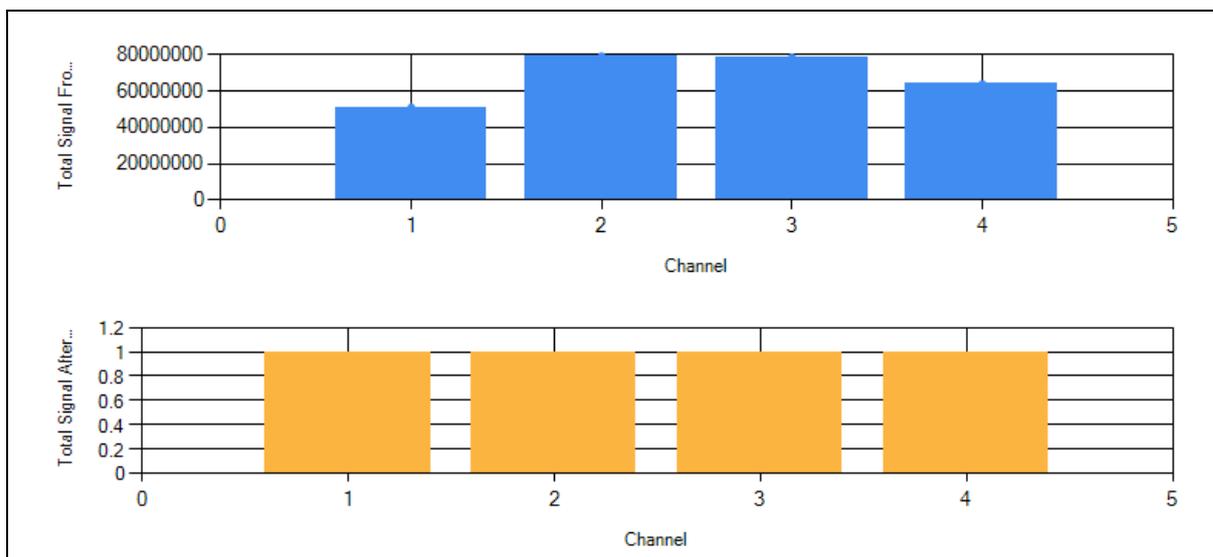


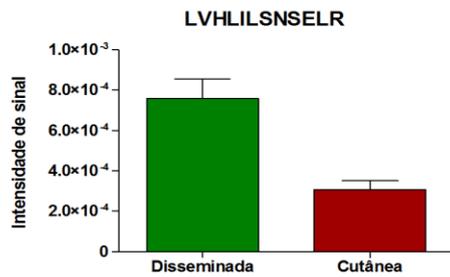
Figura 5.6. Normalização da intensidade dos sinais para quantificação por iTRAQ. Figura representativa da normalização feita para todas as amostras nos quatro canais de quantificação, correspondentes aos quatro marcadores. A Figura mostra os sinais para cada canal antes (Azul) e depois (Amarelo) de aplicar a normalização. Canal 1 e 3 correspondem a marcadores 114 e 116, respectivamente, usados para marcar as amostras da secreção da cepa disseminada, enquanto 2 e 4 correspondem aos marcadores 115 e 117, respectivamente, usados na secreção da cepa cutânea

As 26 proteínas foram quantificadas com mínimo 2 peptídeos, sendo estes, também, peptídeos únicos da proteína. Os valores de *fold change* obtidos para as proteínas diferencialmente abundantes indicam a variação relativa dos sinais de intensidade de massa para os peptídeos marcados e identificados em cada proteína para as duas cepas, disseminada (marcadores 114 e 116) e cutânea localizada (marcadores 115 e 117) (Tabela 5.5). Um exemplo da diferença de abundância observada entre os peptídeos marcados, entre as cepas, é mostrado na Figura 5.7.

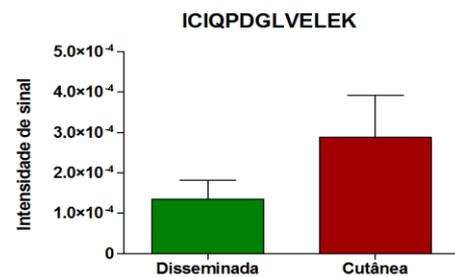
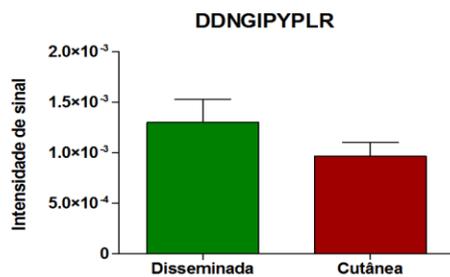
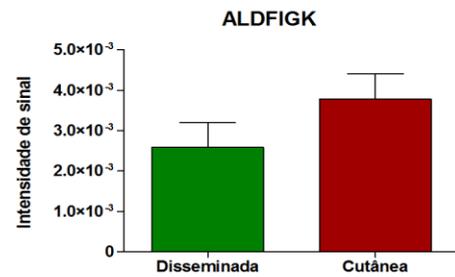
Tabela 5.5. Proteínas diferencialmente abundantes no secretoma da cepa de *L. (V.) braziliensis* associada à forma disseminada da doença em comparação com a cepa cutânea localizada.

Código Uniprot	Nome	Número de peptídeos quantificados	Fold Change	pValue	Cepa Disseminada	Via de Secreção	Ortologia com humano	
							Nome gene	Cod Humano
A4HKT7	Nucleoside diphosphate kinase	3	-2.5	0.003	Down	Alternativa - Exo	NME1	P15531
O44010	60S acidic ribosomal protein P2	2	-2.3	0.007	Down			
A4H440	Surface antigen-like protein	2	-1.8	0.006	Down	Clássica		
A4HKX6	Dihydrolipoyl dehydrogenase	2	-1.8	0.017	Down		DLD	P09622
A4H5R9	Calmodulin	5	-1.8	0.000	Down	Exo	CALM1	P62158
A4H9P0	Heat shock protein	2	-1.8	0.016	Down		HSPA4L	O95757
A4H4C5	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	2	-1.6	0.005	Down	Alternativa - Exo	MTAP	Q13126
A4H746	40S ribosomal protein S12	2	-1.6	0.026	Down	Alternativa - Exo		
A4HPQ8	Adenosylhomocysteinase	3	-1.6	0.003	Down	Exo	AHCY	P23526
A4H638	GP63, leishmanolysin	5	-1.6	0.001	Down	Alternativa		
A4H643	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	3	-1.6	0.004	Down	Alternativa - Exo		
A4H537	Splicing factor pter1-like protein	2	-1.5	0.008	Down	Alternativa		
A4HFU7	Uncharacterized protein	4	-1.5	0.001	Down	Alternativa		
A4HMB3	Aspartate aminotransferase	2	1.9	0.008	Up		GOT1	P17174
A4HLE6	40S ribosomal protein S3	2	1.9	0.008	Up	Exo	RPS3	P23396
A4HN57	T-complex protein 1, eta subunit	2	1.9	0.009	Up	Exo	CCT7	Q99832
A0A088RUF5	Glucose-regulated protein 78,	2	1.9	0.013	Up	Clássica- Exo	HSPA5	P11021
A4HQL2	T-complex protein 1, theta subunit	2	1.8	0.008	Up		CCT8	P50990
A4H6F2	14-3-3 protein	3	1.8	0.002	Up	Exo^	YWHAE	P62258
A4H3T9	Uncharacterized protein	6	1.7	0.000	Up	Clássica		
A4HPA3	Tyrosine aminotransferase	8	1.7	0.000	Up			
A4H7H9	Uncharacterized protein	2	1.6	0.007	Up			
E9JUH4	Trypanothione reductase	3	1.6	0.004	Up	Exo	GSR	P00390
A4H8V4	Elongation factor 1-alpha	2	1.5	0.008	Up	Alternativa - Exo	EEF1A1	P68104
A0A088RIB2	Dipeptidyl-peptidase III,	2	1.5	0.008	Up	Exo	DPP3	Q9NY33
A4HAX5	Uncharacterized protein	3	1.5	0.011	Up	Alternativa		

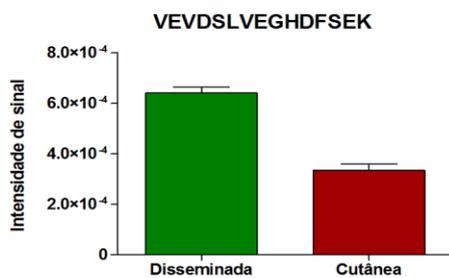
Aspartate aminotransferase



Heat shock protein



Glucose-regulated protein 78



Surface antigen-like protein

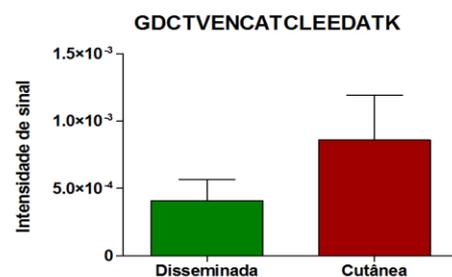
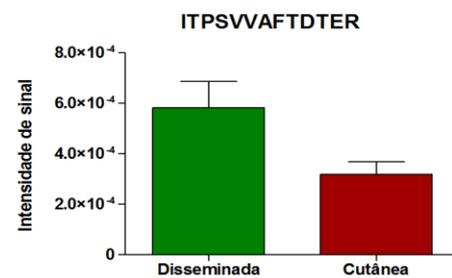
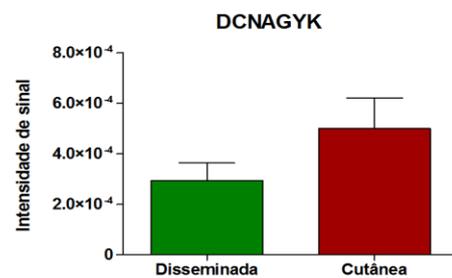


Figura 5.7. Abundância relativa de peptídeos usados para quantificação de proteínas. Exemplos da quantificação de peptídeos de algumas proteínas diferencialmente abundantes nas cepas associadas à manifestação disseminada e cutânea da LTA. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão da intensidade do sinal observada nas replicatas biológicas.

Podemos observar que 17/26 proteínas diferencialmente abundantes são secretadas por vias alternativas incluindo exossomos, duas são secretadas por via clássica e sete não apresentam sinal de secreção (Tabela 5.5). Ao analisar os possíveis processos nos quais estão classificadas as proteínas diferencialmente abundantes, encontramos que as proteínas cuja abundância foi diminuída no secretoma da cepa disseminada (*down-regulated*) estão envolvidas principalmente no metabolismo aminoácidos, nucleosídeos fosfato e carboidratos, bem como na tradução e síntese proteica. Por outro lado, as proteínas com abundância aumentada na secreção da cepa disseminada, em comparação à cepa cutânea, estão envolvidas principalmente na resposta ao estresse, tradução e síntese proteica e, interessante, uma das proteínas (*Dipeptidyl-peptidase III*) se encontra associada à degradação proteica (Tabelas 5.3 e 5.5 e tabela digital 1). As funções moleculares associadas às 26 proteínas quantificadas são, em geral, ligação de pequenas moléculas e atividade como molécula estrutural. Interessantemente, duas proteínas na secreção da cepa disseminada foram classificadas com atividade hidrolase (Tabela digital 1). Em relação às quatro proteínas não caracterizadas diferencialmente abundantes entre as cepas (3 up e 1 down-regulated na cepa disseminada) (Tabela 5.5), encontramos que duas contêm predição de pelo menos um domínio funcional, sendo um domínio Alba (proteína A4HAX5) e um domínio de tioredoxina (proteína A4H7H9). Os domínios Alba estão envolvidos na ligação ao RNA e proteínas contendo estes motivos funcionais estão envolvidas na regulação de fatores de virulência e no processo de diferenciação do parasito (192, 193). O domínio tioredoxina, encontrado na proteína A4H7H9, a qual estava aumentada na secreção da cepa disseminada, atua como antioxidante, facilitando a redução de outras proteínas, através da oxidação reversível de dois grupos –SH vizinhos para uma ponte dissulfeto (194).

5.6 Rede de interação funcional de proteínas diferencialmente abundantes no secretoma das cepas de *L. (V.) braziliensis*.

Para analisar as possíveis interações funcionais entre as proteínas identificadas como diferencialmente abundantes entre as cepas e determinar em quais processos biológicos poderiam estar envolvidas (de maneira conjunta), os genes ortólogos em humanos foram identificados a partir da lista de proteínas de *Leishmania* e

analisados com programas que permitem construir e visualizar redes de interação funcional com base na informação previamente depositada em bancos de dados. Das 26 proteínas diferencialmente abundantes, 15 apresentaram ortólogos em humanos (Tabela 5.5), e com elas foi possível construir a rede de interação mostrada na Figura 5.8. Foi possível observar um grupo bem definido de proteínas cuja abundância foi aumentada na cepa disseminada: proteínas associadas com processos metabólicos proteicos (HSPA5, CCT8, CCT7) (Figura 5.8). Estas proteínas por sua vez estão interconectadas com 196 proteínas diferentes: HSPA5 com 154, CCT8 com 78 e CCT7 com 75, indicando que seu aumento alteraria, potencialmente, a funcionalidade de todas essas proteínas com as quais interagem. Outro processo enriquecido foi o de metabolismo de moléculas pequenas (MTAP, NME1, AHCY, DLD, GOT1 e GSR), apresentando tanto proteínas cuja abundância foi aumentada, como proteínas cuja abundância foi diminuída (Figura 5.8). Duas proteínas aumentadas no secretoma da cepa disseminada foram agrupadas no processo de expressão gênica (RPS3 e EEF1A1). As proteínas restantes estão localizadas em diversos grupos funcionais como resposta imune inata, proteólise, processo viral e enovelamento de proteínas (Figura 5.8).

Ao analisar as interações das proteínas diminuídas na secreção da cepa disseminada foi possível observar que não há nenhuma interação direta entre o grupo de proteínas quantificadas em menor abundância na secreção da cepa disseminada (Tabela 5.6), mas que estas interagem com diferentes classes de proteínas. Por exemplo, encontramos que CALM1 contém o maior número (84) de interações com outras proteínas, incluindo proteínas envolvidas regulação da expressão gênica e na resposta imune inata. Por outro lado, foi possível encontrar três interações diretas entre CALM1 (down)-YWHAE (up), DLD (down)-DPP3 (up) e MTAP (down)-GOT1 (up). Essas três interações diretas associam resposta imune inata com o grupo denominado processo viral (CALM1-YWHAE), o grupo de processo metabólico de pequenas moléculas com proteólise (DLD-DPP3) e uma associação direta entre proteínas agrupadas na categoria de processo metabólico de pequenas moléculas (MTAP-GOT) (Figura 5.8, Tabela 5.6).

Por outro lado, ao analisar o grupo das proteínas cuja abundância foi aumentada na cepa disseminada, encontramos que existem três interações diretas entre proteínas do mesmo grupo de abundância aumentada, RPS3 (up)-YWHAE (up), RPS3(up)-HSPA5(up) e CCT7(up)-CCT8(up). A primeira interação corresponde à relação funcional direta entre expressão gênica (RPS3) e o denominado “processo

viral” (YWHAE); a segunda corresponde à interação entre expressão gênica e processos metabólicos proteicos (HSPA5) e terceira interação corresponde a uma associação direta entre proteínas do mesmo grupo funcional relacionado a processos metabólicos proteicos (CCT7 e CCT8). Interessantemente, além de conter interações intra-grupo, as proteínas *up-regulated* apresentam um maior número de interações diretas, em média, com outras proteínas, sendo que HSPA5 apresenta um total de 154 interações seguida de EEF1A1 com 138, RPS3 com 121 e YWHAE com 100 (Tabela 5.6).

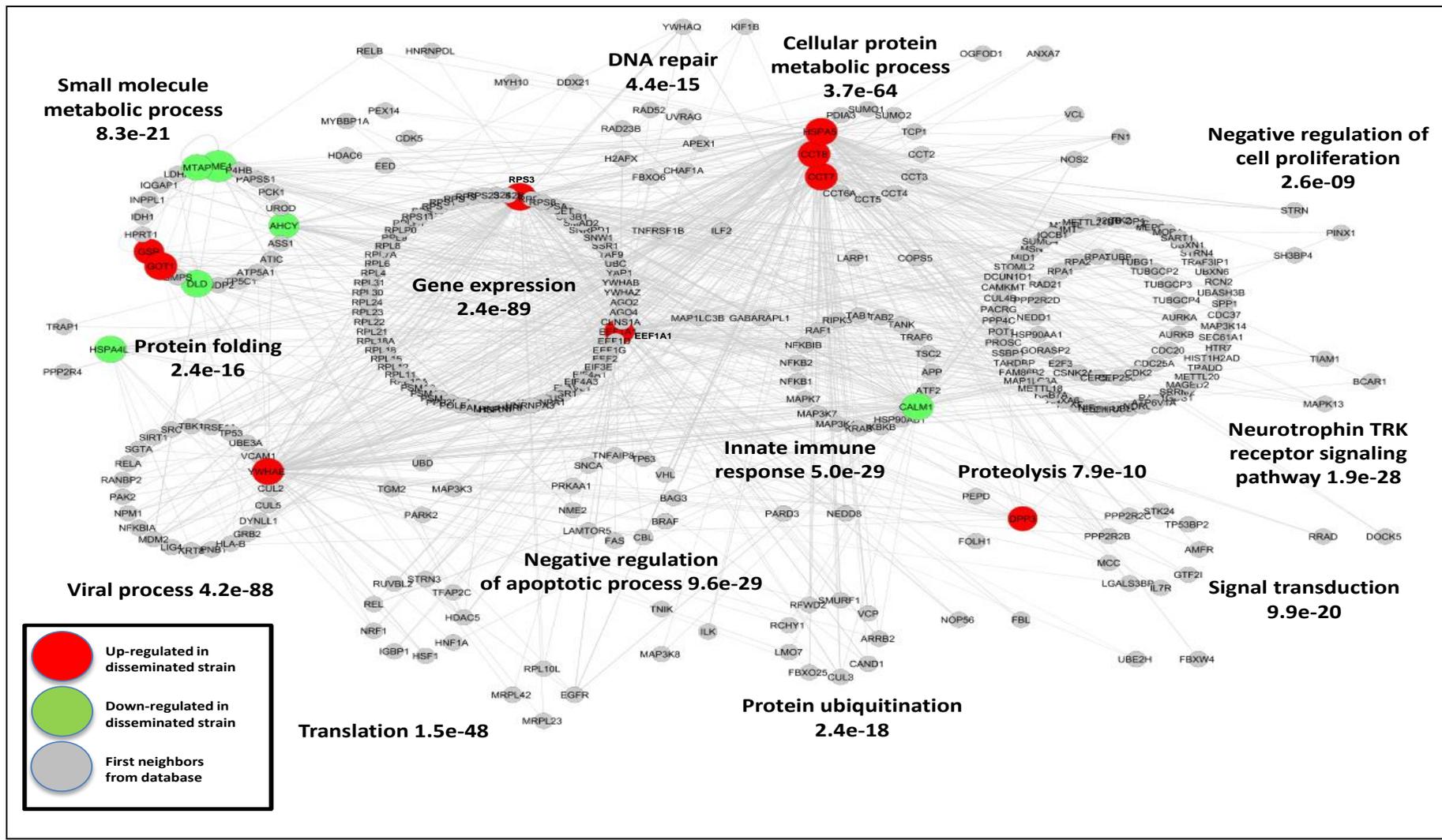


Figura 5.8. Networks para proteínas diferencialmente secretadas de *L. (V.) braziliensis*. Apresenta-se a relação das proteínas diferencialmente secretadas para ambas as cepas com ortologia em humano, sendo apontadas proteínas presentes positivamente para a cepa disseminada em vermelho e em verde as proteínas encontradas aumentadas na secreção da cepa cutânea.

Finalmente, as 894 interações diretas que apresentam as 15 proteínas diferencialmente abundantes (tabela 5.6), indicam que há um grande número de processos modulados pelas proteínas secretadas, bem como uma diferença nos processos afetados pela secreção de cada cepa. Cabe destacar que as proteínas com abundância aumentada na secreção da cepa disseminada apresentaram um maior número de interações quando comparadas às proteínas aumentadas na cepa cutânea, o que poderia implicar em um maior número de processos afetados por esta cepa.

Tabela 5.6. Resumo de interações entre as proteínas diferencialmente abundantes. Mediante a análise da rede de interação foi possível determinar interações diretas entre proteínas diferencialmente abundantes nas cepas de *L. (V.) braziliensis*, assim como os processos envolvidos nelas.

Nome do Gene	# Interações diretas	Quantificação o cepa disseminada	HSPA4L	AHCY	NME1	CALM1	DLD	MTAP	GOT1	RPS3	DPP3	EEF1A1	YWHAE	GSR	HSPA5	CCT7	CCT8	
			<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Down</i>	<i>Up</i>									
HSPA4L	17	<i>Down</i>																
AHCY	34	<i>Down</i>																
NME1	20	<i>Down</i>																
CALM1	84	<i>Down</i>																
DLD	20	<i>Down</i>																
MTAP	16	<i>Down</i>																
GOT1	11	<i>Up</i>																
RPS3	121	<i>Up</i>																
DPP3	14	<i>Up</i>																
EEF1A1	138	<i>Up</i>																
YWHAE	100	<i>Up</i>																
GSR	12	<i>Up</i>																
HSPA5	154	<i>Up</i>																
CCT7	75	<i>Up</i>																
CCT8	78	<i>Up</i>																
Total	894																	

5.7 A expressão gênica ao nível de mRNA apresenta correlação com a abundância de proteínas apenas para alguns genes

A expressão gênica em tripanossomatídeos é caracterizada, geralmente, por uma ausência de correlação entre os níveis de transcritos e os níveis de proteína. Porém, frente à carência de ferramentas alternativas e reagentes, como, por exemplo, anticorpos específicos para as proteínas destes organismos, a qPCR para análise de expressão gênica continua sendo a ferramenta usada para tentar “validar” os dados proteômicos nestes parasitos. Assim, usamos qPCR como metodologia para verificar os níveis de expressão de algumas das proteínas diferencialmente abundantes e analisar se haveria correlação com os níveis de proteína observados. Para esta análise, as proteínas *Heat shock protein (Lbrm_18_1400)*, *S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase (Lbrm_05_0800)*, *60S acidic ribosomal protein P2 (lip2)*, *tyrosine aminotransferase (tat)*, *Glucose-regulated protein 78 (Lpmp_281290)*, e uma proteína não caracterizada (*Lbrm_26_2610*) foram escolhidas para serem quantificadas (Anexo 1). Observamos que os níveis de mRNA de *Lbrm_18_1400*, *lbrm_05_0800* e *lip2* foram significativamente reduzidos ($p < 0.05$) na cepa disseminada, apresentando uma diminuição de 3.8, 2.6 e 2.2 vezes, respectivamente, em relação à cepa cutânea (Figura 5.9), o que se correlaciona com a diminuição observada na análise proteômica. Por outro lado, a análise dos genes *tat* e *Lpmp_281290*, cuja abundância proteica aparece aumentada na cepa disseminada, mostrou que os níveis de mRNA não apresentam diferenças significativas entre as cepas (Figura 5.9). Por fim, os níveis de expressão do gene *Lbrm_26_2610* que corresponde à proteína não caracterizada em *L. (V.) braziliensis*, cuja abundância ao nível de proteína não foi diferente entre as cepas, foram similares entre as cepas, mostrando correlação com o observado ao nível de proteína (Figura 5.9).

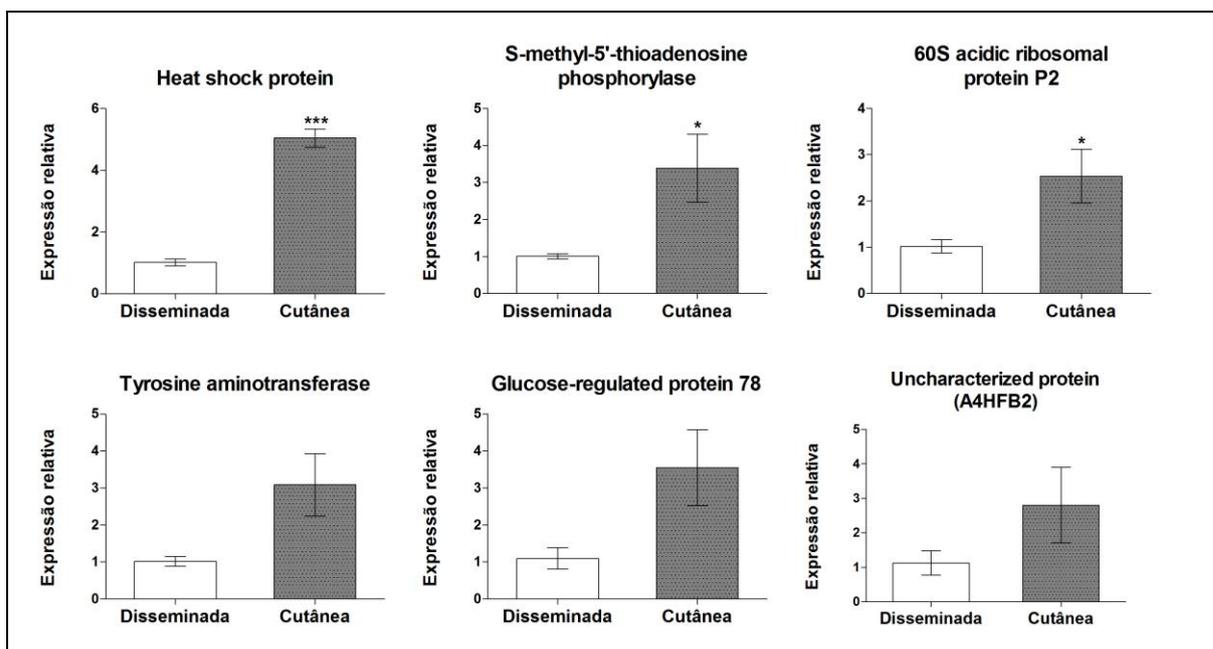


Figura 5.9. Níveis de expressão de genes cuja abundância foi diferencial no secretoma de cepas de *L. (V.) braziliensis*. Os níveis de mRNA de *lbrm_18_1400*, *lbrm_05_0800*, *lip2*, *tat*, *lpmp_281290*, e *lbrm_26_2610*, foram medidos por qPCR em promastigotas de cepas associadas à forma disseminada e cutânea da doença. Os valores são expressos como relações normalizadas entre a expressão do gene alvo e a média geométrica dos genes *40S* e *actina*. As diferenças estatisticamente significativas entre as duas cepas foram calculadas com o teste *t* de Student, usando o programa GraphPad Prism 5.0. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,0007$. Os gráficos representam média \pm desvio padrão de triplicata biológica.

5.8 O pré-tratamento de macrófagos murinos com secreção de *L. (V.) braziliensis* aumenta o número de células infectadas e a cepa disseminada apresenta um maior índice de infecção do que a cepa cutânea.

Para avaliar o efeito da secreção de cada cepa de *L. (V.) braziliensis* sobre a infecção de macrófagos peritoneais *in vitro*, macrófagos murinos pré-incubados (tratamento) ou não (controle) com secreção foram infectados com promastigotas de cada cepa de *L. (V.) braziliensis*. A cinética de infecção foi avaliada entre 24 e 72 horas pós-infecção pela contagem do número de macrófagos infectados em cada tempo, bem como o número de parasitos por macrófago. A Figura 5.10 apresenta a imagem representativa de macrófagos tratados e sem tratar com secreção da cepa disseminada após 72h de infecção com promastigotas da mesma cepa. Os resultados, obtidos de experimentos feitos por triplicata para as duas cepas, mostram que há diferenças no número de células infectadas quando estas são pré-tratadas com a secreção dos parasitos, em todos os tempos analisados (Figura

5.11A). Também é possível observar que há um aumento significativo no número de parasitos/célula, em 24 e 72 h pós-infecção para a cepa disseminada e em 48h pós-infecção para a cepa cutânea, quando os macrófagos são pré-tratados com a secreção (Figura 5.11B). Interessantemente, o cálculo do índice de infecção, multiplicando o número de células infectadas pelo número de parasito por célula, para avaliar carga parasitária sobre os macrófagos, mostra que a cepa disseminada apresenta um maior índice de infecção em todos os tempos quando as células são pré-tratadas com a secreção e que, além disso, este índice é maior do que aquele da cepa cutânea (Figura 5.11C).

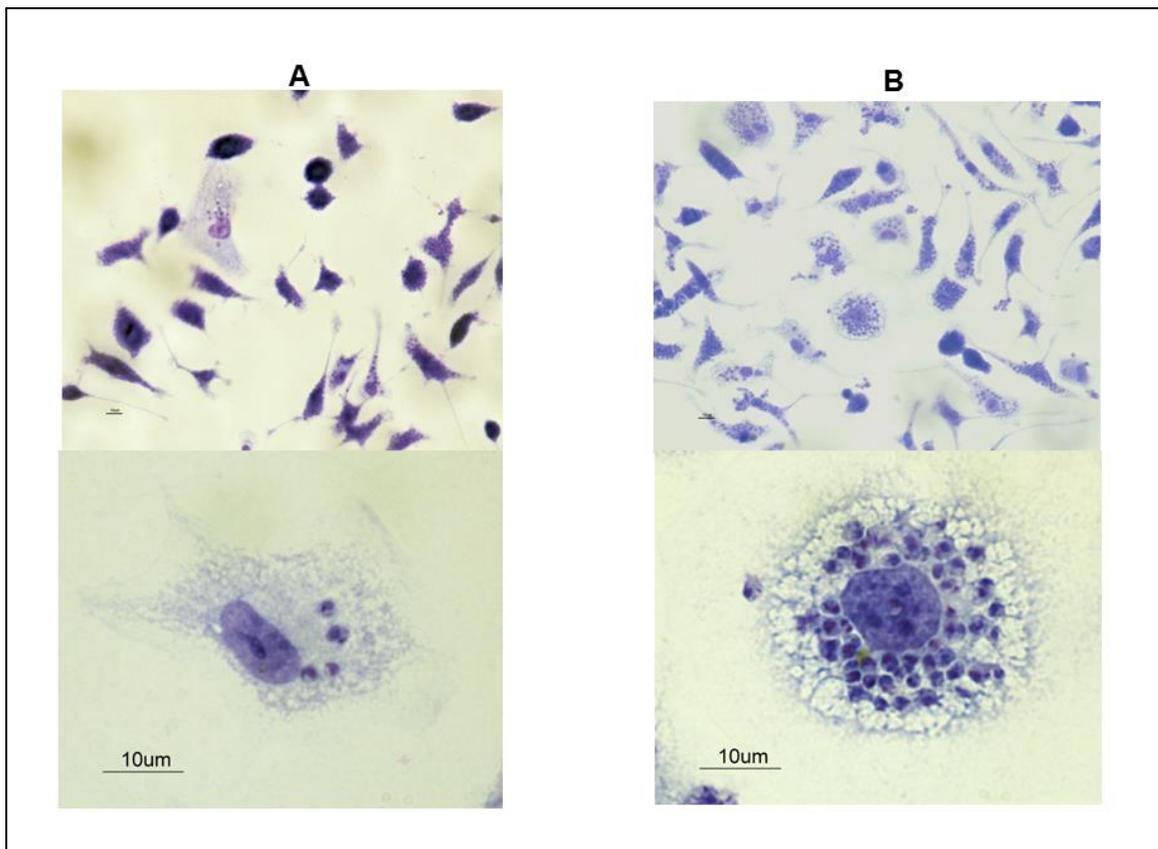


Figura 5.10. Imagem representativa de macrófagos infectados com promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Macrófagos peritoneais murinos não pré-estimulados (A) ou pré-estimulados (B) com secreção da cepa disseminada de *L. (V.) braziliensis* e, posteriormente infectados com promastigotas da mesma cepa e corados 72 h após infecção.

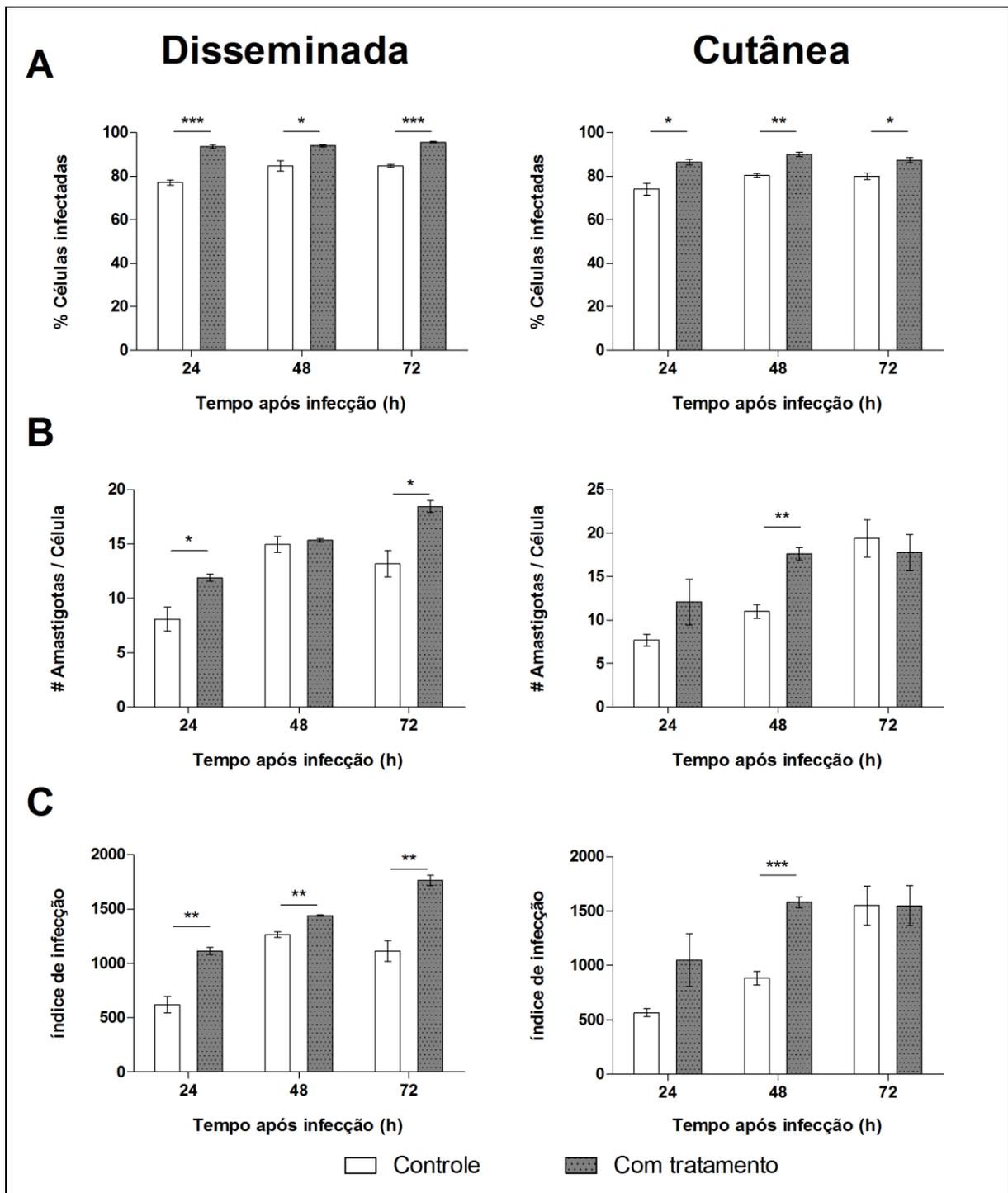


Figura 5.11. Efeito do pré-tratamento com secreção sobre a infecção *in vitro* de *L. (V.) braziliensis*. Macrófagos tratados ou não com secreção de cada cepa de *L. (V.) braziliensis* foram infectados com promastigotas da cepa correspondente. A cinética de infecção foi seguida por 24, 48 e 72 h pós-infecção. (A) percentagem de células infectadas; (B) número de parasitos por macrófago; (C) índice de infecção (AxB). As diferenças estatisticamente significativas entre o controle e tratamento foram calculadas com o teste *t* de Student, usando o programa GraphPad Prism 5.0. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,005$ e (***) $p < 0,001$. Os gráficos representam média \pm desvio padrão.

5.9 Quantificação de citocinas secretadas por macrófagos submetidos à infecção com *L. (V.) braziliensis*.

Para avaliar se as diferenças nos índices de infecção entre as cepas poderiam ter alguma relação com a forma de ativação dos macrófagos pré-estimulados ou não com secreção, os níveis de um painel de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras potencialmente secretadas pelos macrófagos foi medido por citometria de fluxo. Os níveis de IL-6, IL-10, CCL2 (MCP-1), IFN- γ , TNF- α , e IL-12p70 foram medidos usando um kit comercial de CBA (*Cytometric Beads Array*), de acordo com as instruções do kit. Os níveis de citocinas foram medidos em macrófagos estimulados com secreção e infectados, como também em macrófagos não estimulados e infectados, 24, 48 e 72 h pós-infecção.

Observamos diferenças significativas nos níveis de citocinas secretadas por macrófagos pré-tratados com secreção em comparação aos não tratados, bem como diferenças significativas entre as cepas infectantes. No caso de TNF- α , observamos que existe um nível significativamente maior da citocina na secreção de macrófagos pré-estimulados com secreção da cepa cutânea do que naqueles estimulados com a cepa disseminada em todos os tempos analisados (Figura 5.12A). Este mesmo resultado foi observado quando macrófagos não estimulados foram infectados com os parasitos (Figura 5.13A). De fato, nos macrófagos com e sem estimulação com a secreção da cepa disseminada e infectados com a mesma cepa, os níveis desta citocina foram entre 4-8 vezes inferiores quando comparados com a cepa cutânea, em todos os tempos analisados (Figura 5.12A e 5.13A). Interessantemente, após 72h de infecção, os macrófagos pré-estimulados com secreção da cepa disseminada apresentam níveis significativamente menores de TNF- α em comparação ao grupo controle (Figura 5.12A).

Similar ao observado com TNF- α , tanto a pré-estimulação com secreção da cepa cutânea como a infecção com estes parasitos induziu níveis maiores de CCL2 e IL-6 nos macrófagos infectados do que o tratamento e/ou infecção com a cepa disseminada (Figura 5.12D e F e Figura 5.13D e F). Interessantemente, IL-12 e IFN- γ foram estimulados preferencialmente pela infecção com os parasitos (Figura 5.13B e C) e não pela pré-estimulação com secreção (Figura 5.12B e C). De fato, macrófagos infectados com a cepa cutânea apresentam níveis elevados de IL-12 em todos os tempos analisados, ao passo que em macrófagos infectados com a cepa

disseminada só foram detectados níveis desta citocina após 48 h pós-infecção e estes são três vezes menores que os observados na cepa cutânea (Figura 5.13B).

Os níveis de IFN-gama foram estimulados pela infecção com os parasitos da cepa cutânea (Figura 5.13C), mas essa produção não foi observada nos macrófagos pré-tratados com a secreção da cepa (Figura 5.12C). Por outro lado, nem a cepa disseminada nem o pré-tratamento com sua secreção estimularam a produção desta citocina (Figura 5.12C e Figura 5.13C). Observamos também que a pré-estimulação com secreção da cepa cutânea induz níveis significativamente maiores de IL-10 do que a cepa disseminada após 72 h pós-infecção (Figura 5.12E). Embora a diferença não seja significativa, macrófagos não tratados e infectados com a cepa cutânea apresentam níveis maiores de IL-10 em todos os tempos, quando comparados à cepa disseminada.

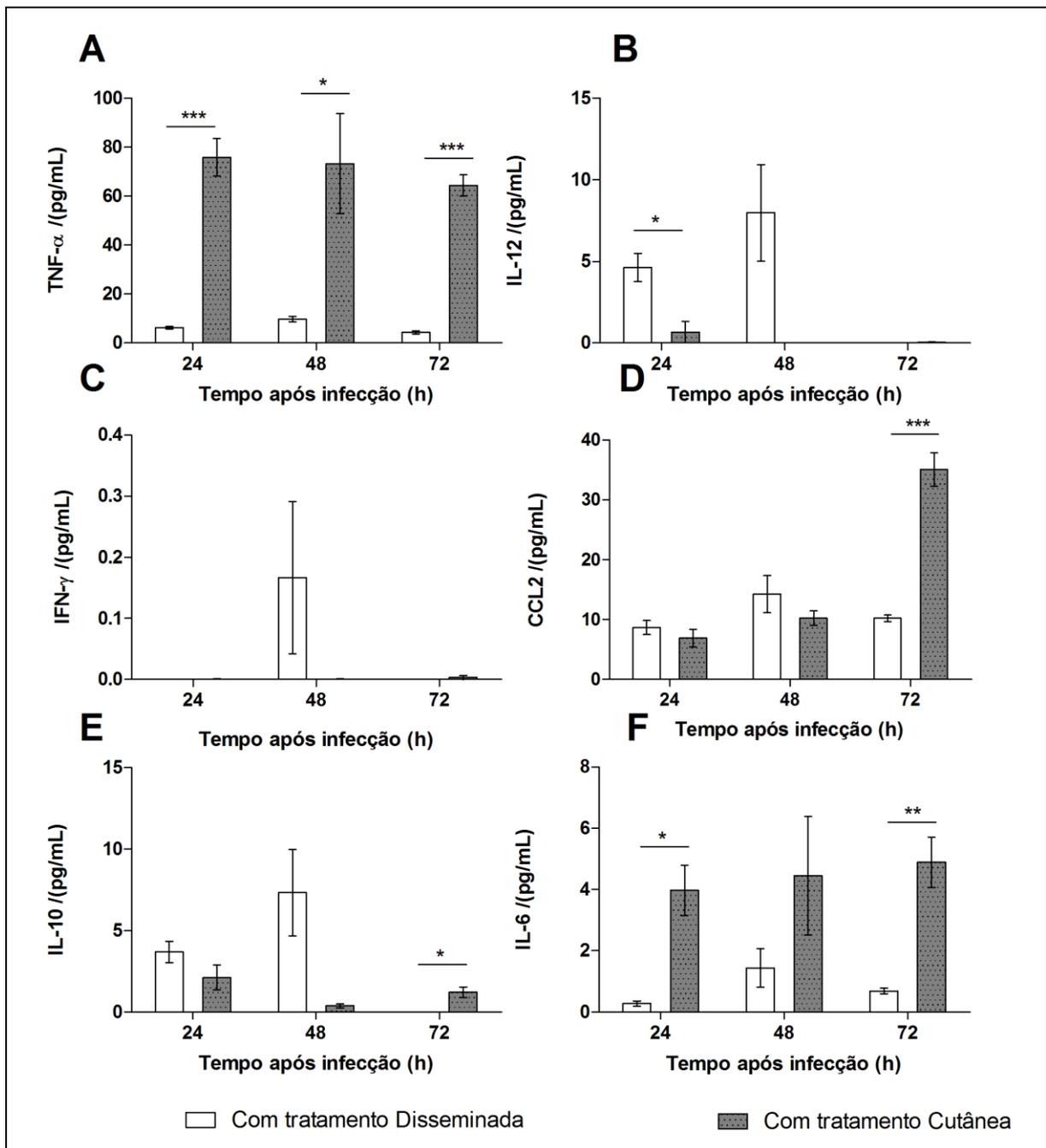


Figura 5.12. Quantificação de citocinas secretadas por macrófagos murinos pré-estimulados com secreção da cepa disseminada ou da cepa cutânea. As citocinas foram quantificadas por citometria de fluxo em macrófagos pré-estimulados com secreção da cepa disseminada ou cutânea e infectados com a cepa homóloga. As diferenças estatisticamente significativas entre o controle e tratamento foram calculadas com o teste *t* de Student, usando o programa GraphPad Prism 5.0. (*) $p < 0,04$ e (**) $p < 0,008$; (***) $p < 0,0009$. As barras representam média \pm desvio padrão.

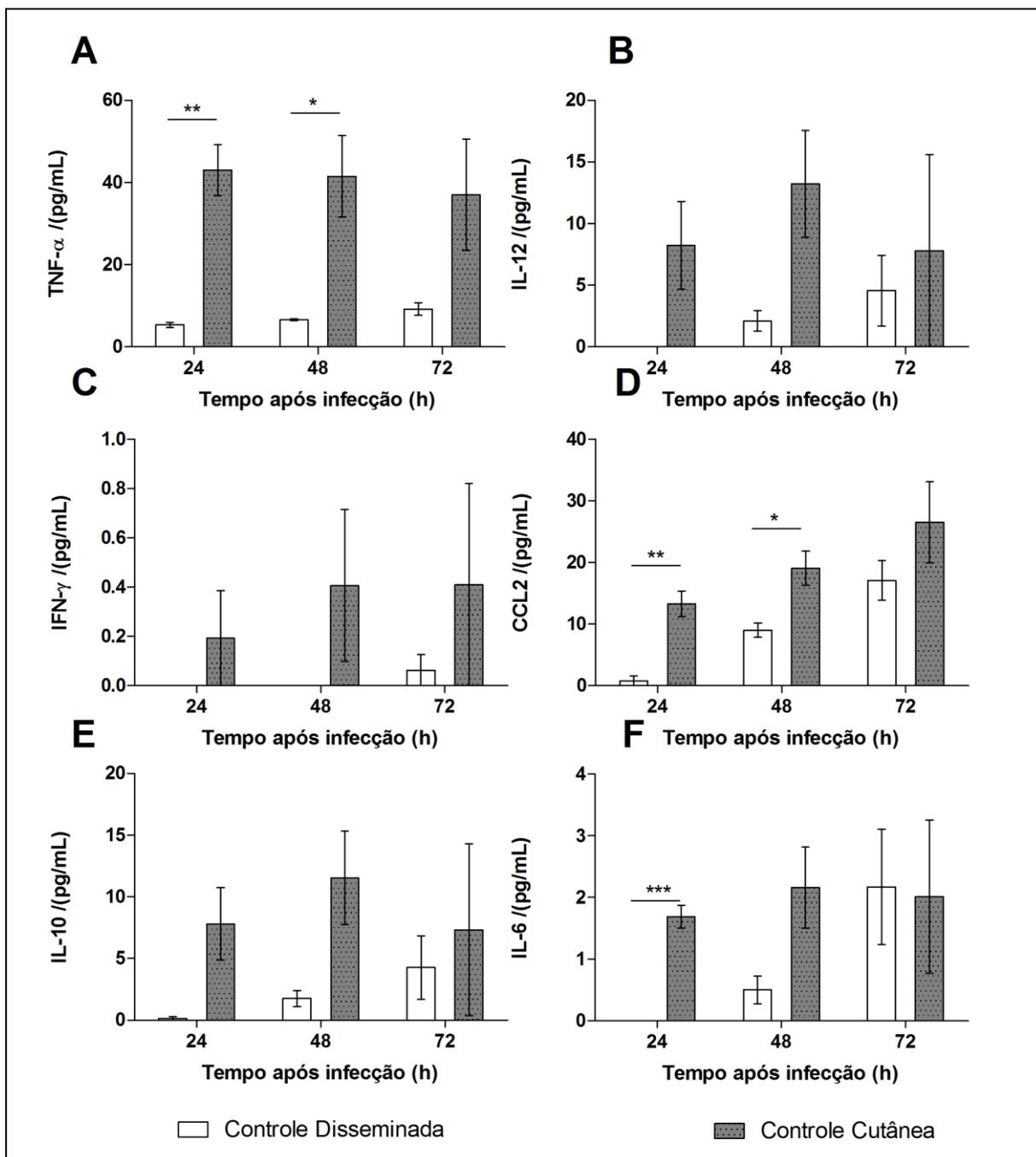


Figura 5.13 Quantificação de citocinas secretadas por macrófagos murinos infectados com a cepa disseminada ou cutânea de *L. (V.) braziliensis*. As citocinas foram quantificadas por citometria de fluxo em macrófagos infectados com a cepa disseminada ou cutânea. As diferenças estatisticamente significativas entre o controle e tratamento foram calculadas com o teste *t* de Student, usando o programa GraphPad Prism 5.0. (*) $p < 0,03$; (**) $p < 0,006$ e (***) $p < 0,0009$. As barras representam média \pm desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

Leishmania (V.) braziliensis é uma espécie associada, com frequência, a uma “plasticidade clínica” que abrange desde lesões cutâneas localizadas autorresolutivas até formas disseminadas com lesões múltiplas e de difícil tratamento. Embora a manifestação clínica seja um fenômeno multifatorial que envolve diversos aspectos do hospedeiro tais como o *status* imune, *status* nutricional, *background* genético, é também aceito que aspectos intrínsecos do parasito modulam o processo patogênico e podem determinar a forma clínica da doença (89, 96, 168). Porém, ainda não é claro como e por que algumas cepas de *L. (V.) braziliensis* disseminam metastaticamente ao passo que outras não. As cepas estudadas nesta tese foram isoladas de pacientes com manifestações clínicas muito polares: cutânea localizada autorresolutiva e disseminada. Estes fenótipos clínicos foram reproduzidos no modelo macaco (89, 96), sugerindo que características intrínsecas do parasito estariam envolvidas na produção desses fenótipos. Nesse contexto, as cepas estudadas aqui representam um modelo apropriado para abordar essa questão da disseminação do parasito. Então, com o objetivo de identificar fatores moleculares que poderiam estar associados ao fenótipo clínico, utilizamos uma abordagem proteômica para identificar e quantificar comparativamente proteínas secretadas pelas cepas de *L. (V.) braziliensis*.

A liberação de moléculas para o meio extracelular por parasitos do gênero *Leishmania* tem sido apontada como um dos mecanismos que o protozoário utiliza para evadir ou subverter a resposta imune do hospedeiro (68). As primeiras análises sobre proteínas secretadas para o meio extracelular pelos parasitos já mostravam que estas moléculas são as principais mediadoras das interações parasito-hospedeiro, pois estão envolvidas na imunoregulação, sinalização, resistência a quimioterápicos bem como na invasão e lise da célula hospedeira (195). Assim, o racional deste trabalho foi identificar e quantificar em grande escala proteínas secretadas pelas distintas cepas do parasito como uma primeira aproximação ao entendimento do papel do parasito no desenvolvimento das formas polares da doença causada por *L. (V.) braziliensis*.

A análise proteômica permitiu identificar 252 proteínas no secretoma desta espécie; este número está de acordo com prévios trabalhos para outras espécies de *Leishmania* e outros tripanosomatídeos, que mostram um número similar de

proteínas identificadas (117, 164). Por exemplo, para *L. (L.) donovani*, os autores observaram 151 (117), 158 em *L. (L.) infantum* (163), em *T. cruzi* 345 para epimastigotas e 265 para tripamastigotas metacíclicas (164), indicando que, em geral, em meio condicionado, o número de proteínas secretadas é similar nestes parasitos. O primeiro trabalho sobre o secretoma de *L. (V.) braziliensis*, desenvolvido também pelo nosso grupo, detectou um número similar de proteínas no gel bi-dimensional, porém, o número de proteínas identificadas foi muito menor devido às limitações da técnica (116). Contudo, tanto nossos trabalhos, como os reportados por outros autores, são consistentes em demonstrar que os parasitos secretam proteínas envolvidas com tradução de sinais, sobrevivência intracelular e modulação da resposta imune. Proteínas como a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), fosfatase ácida, fator de alongação 1 β , triparedoxina peroxidase e o receptor da proteína cinase C ativada (LACK), que estão envolvidas no enovelamento de proteínas, na regulação do ciclo celular e na resistência ao estresse oxidativo, têm sido sistematicamente identificadas nas secreções desses parasitos (116, 117, 164). Da mesma forma que o reportado para o secretoma de *L. (L.) mexicana* (118), aqui observamos que a maioria das proteínas secretadas tem atividade catalítica, indicando que ocorre um empacotamento e transporte específico de certas proteínas e grupos funcionais.

Observamos aqui também que *L. (V.) braziliensis* secreta proteínas por diversas vias, sendo a via clássica a menos representada na análise, ao passo que a maioria das proteínas parece ser exportada ao meio extracelular através de exossomos (165). Em relação às vias de secreção, também há concordância entre nossas observações e os dados reportados previamente sobre a percentagem de proteínas secretadas que contem peptídeo sinal, ou seja, a percentagem de proteínas que são secretadas pela via clássica. O trabalho prévio do nosso grupo com *L. (V.) braziliensis*, bem como os trabalhos com *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, e *T. cruzi*, mostram que esta percentagem não supera 9 % (116, 117, 163, 164). De fato, do mesmo modo que em *L. (L.) donovani*, ~95% das proteínas aqui identificadas carecem de sinal específico de direcionamento, sugerindo que a secreção de proteínas nestes parasitos é baseada em mecanismos não convencionais.

Em geral é aceito que as proteínas que serão secretadas e aquelas que serão enviadas para a mitocôndria apresentam um peptídeo sinal em sua extremidade N-terminal que indica sua localização. Esse peptídeo é reconhecido e processado no

retículo endoplasmático rugoso (RE) de maneira concomitante à síntese da proteína (196). Posteriormente a proteína que teve o peptídeo sinal processado segue para seu destino. Este mecanismo foi denominado como via clássica de exportação de proteínas (196, 197). Por outro lado, os estudos proteômicos em larga escala têm revelado que há uma grande porcentagem de proteínas sendo secretadas por vias alternativas e que essas vias são mediadas por uma variedade de mecanismos de exportação (10). Entre os mecanismos “não convencionais”, o que envolve exossomos de origem endossomal, parece ser a principal via para secreção de proteínas em parasitos protozoários (116, 165, 198). O mecanismo de liberação de proteínas baseado em microvesículas exossomais pode proteger as proteínas que são exportadas durante seu percurso no meio extracelular e pode representar um mecanismo eficiente e rápido de propagar informação célula-célula (199, 200). Em *L. (L.) donovani* foi observado que proteínas secretadas por exossomos modificam a resposta da célula hospedeira frente ao parasito (165, 198). Duas questões sobre o mecanismo de exportação via exossomos ainda não foram totalmente esclarecidas. Por um lado, existe a discussão sobre se a liberação de exossomos é uma forma de comunicação celular deliberada e, por outro lado, é intrigante o mecanismo pelo qual o conteúdo exossomal é liberado no citoplasma (201, 202). Contudo, a observação de que células cancerosas secretam para o meio extracelular maior quantidade de exossomos do que células saudáveis, e que o seu conteúdo é diferente, indica que os exossomos são claramente um meio importante de comunicação celular (202).

Em relação à predição das potenciais vias de secreção de proteínas em *L. (V.) braziliensis*, é importante destacar que nenhum dos softwares de predição usados aqui, ou nos outros trabalhos mencionados, foi desenvolvido especificamente para parasitos protozoários; de fato, esses programas foram criados para fazer predições em eucariotos e bactérias, baseados nos modelos melhor estudados. Contudo, acreditamos que as predições aqui obtidas sejam muito próximas à realidade dado que muitas proteínas ortólogas aqui identificadas são exportadas por vias não convencionais e o proteoma exossomal de mamíferos coincide em ~60% com as proteínas aqui identificadas (203).

A predição feita para a localização subcelular usando o TargetP 1.1 revelou que ~13% das proteínas identificadas no secretoma teria uma localização mitocondrial. De acordo com este resultado, nosso grupo anteriormente reportou que, para *L. (V.) braziliensis*, ~10% das identificações apresentaram predição de sinal N-terminal mitocondrial (116). Também, usando o software de predição

TMHMM observamos que 22 proteínas secretadas apresentaram potenciais hélices transmembrana nas suas seqüências. Similarmente, os secretomas de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) mexicana* também reportaram proteínas associadas com componente mitocondrial e/ou apresentando hélices transmembrana (117, 118), reforçando que a presença desse tipo de proteínas na secreção é um fenômeno comum no gênero. A identificação destas proteínas é intrigante e poderia ser devida à (i) ruptura de parasitos e organelas subcelulares e liberação de conteúdo mitocondrial durante o ensaio de secreção; (ii) erro na predição; ou (iii) existência de proteínas com mais de uma função distinta no espaço intra- e extracelular. Visto que o secretoma foi coletado apenas de parasitos que apresentaram 97% de viabilidade no final do ensaio, podemos afirmar que os parasitos estavam íntegros durante o ensaio e que ruptura de 3% não seria suficiente para ser detectável na amostra. Embora erros na predição não possam ser descartados, acreditamos que nosso achado reforça a ideia de que proteínas de *Leishmania* podem exercer mais de uma função, em distintos compartimentos celulares e no espaço extracelular, como tem sido observado para outros organismos (134, 135, 137-139, 185).

A descrição destas proteínas multitarefa, denominadas “*moonlight proteins*”, tem aumentado nas últimas décadas com o surgimento de metodologias mais sensíveis para a identificação de proteínas e sugere que o proteoma é altamente dinâmico e que formas distintas de proteínas (modificadas, por exemplo) podem exercer distintas funções, ainda desconhecidas, no meio extracelular. Nossos resultados revelam que a habilidade de proteínas multitarefas para realizar diferentes funções pode não ser uma característica exclusiva de eucariotos superiores, mas, pelo contrario, um fenômeno conservado em distintos táxons. Também é possível formular a hipótese de que a exposição ao meio de secreção (meio condicionado, mínimo) gera um estímulo tal que os parasitos “sentem” a mudança nas condições de cultivo e começam a expressar e exportar uma grande quantidade de proteínas que seriam importantes para a sobrevivência no novo “ambiente”. Esse meio mínimo também pode exercer um sinal de diferenciação, preparando os parasitos para lidar com o “novo ambiente”. Um achado que reforça esta ideia é a identificação de amastina, uma proteína que é mais expressa na forma amastigota e é requerida para a virulência de *L. (V.) braziliensis* (204, 205).

Outro achado intrigante no secretoma de *L. (V.) braziliensis* é a identificação de proteínas associadas ao citoesqueleto tais como a proteína *cofilin-like* (A4HH52), α -tubulina (A4H727), actina (C6KJD9) e β -tubulina (A4HLC9). Segundo a nossa

análise por ExoCarta, estas proteínas são secretadas por exossomos e, embora sua função no meio extracelular não seja conhecida, têm sido observadas também no secretoma de diferentes linhagens de células cancerosas, de células epiteliais tímicas, em urina, e em saliva (206-211). Actina também tem sido encontrada no sobrenadante de macrófagos humanos infectados com HIV (212, 213). Recentemente foi demonstrado que actina é secretada por linhagens celulares de *Anopheles gambiae* após serem desafiadas com bactérias, mediando a fagocitose e morte direta dos micro-organismos e agindo na resposta imune frente a *Plasmodium* (214). Assim, estes trabalhos revelam novas funções extracelulares para estas proteínas que têm sido consideradas, por muito tempo, como exclusivamente intracelulares.

Outro grupo relevante de proteínas identificadas é aquele de resposta ao estresse, no qual foram observadas proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSP). Durante as primeiras horas de infecção, os promastigotas são submetidos a múltiplos estímulos de estresse que podem induzir modificações de estruturas secundárias e agregação das proteínas, as quais são reparadas pela função de chaperonas das HSP. Contudo, atualmente é reconhecido e bem estabelecido que as HSP exercem funções distintas às de chaperonas no meio extracelular (215). No caso de células do sistema imune, as HSP extracelulares atuam como sinalizadores em condições de estresse, alertando outras células, evitando, assim, a extensão do dano e favorecendo a resolução (215, 216). De forma similar em *Leishmania*, pode ser sugerido que a secreção destas proteínas para o meio extracelular também seja um mecanismo para alertar a população de parasitos perante o estresse sofrido durante a mudança de ambiente e invasão das novas células hospedeiras.

Também já foi estabelecido que a maioria de HSP não apresenta peptídeo sinal de secreção, sendo então exportadas por vias alternativas (215, 216). De fato, de acordo com análise por ExoCarta, várias das HSP aqui identificadas são potencialmente secretadas por exossomos, reforçando a ideia que *L. (V.) braziliensis* secreta estas proteínas para o meio extracelular onde poderiam exercer funções de ativação (ou desativação) de vias de sinalização. Embora sua função extracelular não tenha sido esclarecida, a HSP70 tem sido observada nos secretomas de *L. (V.) braziliensis* (116), *L. (L.) donovani* (117, 165) e, visto que em linhagens celulares humanas a HSP70 extracelular exerce funções imunomoduladoras, ativando macrófagos e induzindo a produção de TNF- α (216), é possível sugerir que estas

proteínas em *Leishmania* exercem uma função similar de ativação de macrófagos, com posterior recrutamento de mais células, garantindo a infecção de um maior número de células hospedeiras.

HSP83, identificada na secreção de *L. (V.) braziliensis*, é uma proteína ortóloga da HSP90 de mamíferos a qual está envolvida em vias anti-apoptóticas mitocondriais (217). Em *Leishmania* tem sido observada sendo superexpressa em parasitos resistentes ao antimonial e exercendo um papel protetor contra apoptose induzida pelo medicamento (218). No meio extracelular, esta proteína poderia exercer um papel similar protetor contra sinais de morte celular. Além disso, tanto HSP70 como HSP83 têm sido encontradas no citoplasma de macrófagos infectados com *Leishmania*, indicando que podem ser moléculas secretadas também pelos amastigotas (165, 219).

A proteína *glucose-regulated protein 78* (GRP78), também denominada *heat shock protein family A (Hsp70) member 5* (HSPA5), é outra proteína identificada no nosso trabalho. Esta proteína pertence à família das HSP70 e tem sido encontrada também no secretoma de *L. (L.) donovani* (117) e ativamente secretada por células cancerígenas, aparentemente promovendo metástase (220-222). Tem sido sugerido que esta proteína pode modular o processo de diferenciação do parasito, quesito fundamental para a sobrevivência de *Leishmania* (223).

Proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo como *trypanothione reductase*, *peroxidoxin*, *tryparedoxin peroxidase*, *tryparedoxin*, *thiol-dependent reductase*, *superoxide dismutase*, e *trypanothione synthetase* também foram enriquecidas no secretoma de *L. (V.) braziliensis* e têm sido observadas nos secretomas de outras espécies de *Leishmania* e em *T. cruzi* (116, 117, 163-165). A tripanotiona redutase mantém em sua forma reduzida de ditiol a tripanotiona, a qual por sua vez protege o parasito contra o estresse oxidativo através dos sistemas de peroxidases (224). Assim, a tripanotiona redutase é uma proteína essencial para a sobrevivência do parasito. Os ortólogos destas enzimas do sistema de redução de tióis têm sido encontrados na secreção, via exossomos, de várias linhagens celulares de câncer (225, 226). Contudo, seu papel no espaço extracelular e especificamente na metástase não tem sido esclarecido.

O grupo de peptidases identificado na secreção também foi significativo e, já que varias delas são consideradas fatores de virulência, sua presença na secreção pode indicar um papel importante durante os momentos iniciais da infecção. Tanto metalo- quanto cisteina-peptidases têm sido as classes de peptidases mais

estudadas em *Leishmania* (227-230). Uma das metalopeptidases identificadas no secretoma de *L. (V.) braziliensis* é a glicoproteína de superfície de 63 kDa, GP63. Há evidências de que esta peptidase esteja envolvida na evasão/supressão da resposta imune do hospedeiro, promovendo assim a sobrevivência do parasito dentro do macrófago (118, 165, 231). De fato GP63 foi encontrada no citoplasma de macrófagos incubados com sobrenadantes de cultivo de *Leishmania* livres de parasito (231) indicando que esta proteína é secretada para o meio extracelular e é capaz de atravessar a membrana do macrófago. Uma vez em contato com o macrófago, GP63 é capaz de ativar várias tirosinas fosfatases que defosforilam moléculas cruciais para vias de sinalização que dariam início à cascata microbicida. Com a inibição destes sinais, o macrófago não consegue controlar a proliferação do parasito (118, 165, 231).

Identificamos também três oligopeptidases e duas cisteína peptidases. Entre as oligopeptidases, identificamos a *prolyl oligopeptidase*, POP, (A4HQJ7), uma serina peptidase que cliva peptídeos menores de 3 kDa com atividade biológica, tais como neurotransmissores e hormônios (232). A presença extracelular desta serino peptidase poderia modificar o ambiente extracelular garantindo a invasão, visto que supressão da sua atividade com inibidores específicos impede a colonização de células hospedeiras e posterior patogênese em infecções com *Toxoplasma gondii* e *Acanthamoeba healyi* (233, 234). Em tripanosomatídeos, especificamente em *T. cruzi*, serino peptidases extracelulares têm sido associadas à disseminação do parasito em células hospedeiras, principalmente devido a sua ação contra proteínas do tecido conetivo, como diferentes tipos de colágeno (235). Por sua vez, as cisteino peptidases, particularmente as do tipo calpaína, são endopeptidases dependentes de cálcio que apresentam uma atividade ótima em condições ácidas. Portanto, nos momentos iniciais da infecção no mamífero, quando o parasito é submetido ao novo ambiente intracelular que apresenta pH ácido e alta temperatura, a atividade destas peptidases é favorecida, sendo assim, principalmente observada em amastigotas (236). A expressão diminuída destas peptidases foi associada à atenuação da virulência de *L. (L.) mexicana* e aumento de resposta Th1 (236). Embora seu papel na secreção de *Leishmania* seja desconhecido, é possível sugerir que tenham uma função pró-inflamatória, visto que calpaínas de mamíferos são secretadas durante processos inflamatórios e desempenham um papel nesse microambiente, recrutando células inflamatórias (237-239).

Outra classe de proteínas identificadas em nosso estudo é a das fosfatases. Na secreção de *L. (V.) braziliensis* foram identificadas duas fosfatases ácidas (AcP), uma proteína *phosphatase-like* e uma proteína não caracterizada (A4HE10) que apresentou uma predição de domínio de proteína fosfatase 2C (PP2C). As AcP são fosfatases que hidrolisam substratos orgânicos fosforilados extracelulares liberando fosfato inorgânico (Pi) e obtendo assim nutrientes necessários para o parasito (240). Já se observou que a privação de Pi induz um aumento na atividade destas enzimas, o qual se correlaciona com a proliferação dos parasitos (241-243). Estas enzimas são secretadas via peptídeo sinal, tanto por promastigotas como por amastigotas de várias espécies de *Leishmania* (116, 157, 244). Foi demonstrado que estas ecto-fosfatases são capazes de inibir a produção de ânion superóxido pelos neutrófilos (245) e que a sua superexpressão induz um aumento da virulência dos parasitos (246).

Ao passo que macrófagos produzem moléculas antimicrobianas tais como ROS e NO, que controlam a proliferação do parasito, *Leishmania* tem numerosos mecanismos de evasão da resposta imune, um dos quais é a inativação da sinalização pela via MAPK (proteína quinases ativadas por mitógenos). Tem sido observado que esta inativação se dá através de tirosina fosfatases (PTP) e serino/treonina fosfatases, que por sua vez são ativadas pela ação de peptidases secretadas pelo parasito (231). Nossos resultados indicam que os parasitos não apenas secretam peptidases capazes de ativar tirosina fosfatases como também secretam fosfatases *per se*, tais como a PP2C, uma das quatro principais classes de serino/treonina fosfatases. Estas serino/treonina fosfatases teriam a capacidade de defosforilar MAPK, induzindo assim uma falha frente ao estímulo com IFN- γ e inibição da expressão de iNOS (247, 248). Contudo, ainda precisa ser demonstrado se a PP2C secretada *por L. (V.) braziliensis* é capaz de ser translocada do meio extracelular para o interior do macrófago e se realmente pode inativar as MAPK da célula hospedeira. Embora este tipo de fosfatases não tenham sido encontradas diferencialmente expressas entre as cepas, a presença de fosfatases no secretoma do parasito confirma a relevância desta fração na sobrevivência do parasito nos primeiros momentos de infecção pela modulação da resposta microbicida do macrófago.

Dentre as proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos destacamos três para as quais tem sido atribuída uma função no espaço extracelular: a enolase, a frutose-1,6-bisfosfato aldolase e a triosefosfato isomerase. A enolase e a frutose-

1,6-bisfosfato aldolase são secretadas por várias espécies de *Leishmania* (116, 117, 165, 249, 250) e são capazes de unir-se a plasminogênio, um componente do sistema fibrinolítico do hospedeiro (249, 250). Esta união favorece a invasão celular e a disseminação, pois sinaliza a ativação de plasmina, uma serino peptidase que degrada componentes de matriz extracelular, entre outros, favorecendo potencialmente a disseminação do parasito (251, 252). Já a triosefosfato isomerase tem sido atribuída a uma potencial função como molécula de adesão, modulando a interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com moléculas de matriz extracelular como laminina e favorecendo assim a invasão da célula hospedeira (253). Assim, estas enzimas somam-se à lista de potenciais proteínas multitarefa identificadas em *Leishmania*.

Nossa análise indica que as proteínas identificadas no secretoma de *L. (V.) braziliensis* são capazes de modular a interação com as células do hospedeiro através de diferentes mecanismos incluindo proteólise, desfosforilação, imunomodulação e degradação de componentes de matriz extracelular, entre outros, os quais, em conjunto, podem modular a ativação dos macrófagos e induzir uma maior sensibilidade do hospedeiro frente à invasão do parasito, e permitindo o estabelecimento da infecção. Esta ideia é reforçada pelas nossas observações de que macrófagos murinos pré-tratados com secreção de cada uma das cepas foram mais susceptíveis à infecção com os parasitos do que macrófagos sem pré-tratamento. Tanto o número de células infectadas quanto o número de parasitos por célula aumentou nos macrófagos pré-tratados com secreção em comparação aos não tratados. Além disso, observamos que o índice de infecção é maior para a cepa disseminada após 72 h de infecção em macrófagos pré-estimulados em comparação com seu controle e que essa diferença não foi verificada na cepa cutânea. Esses achados sugerem que pode haver diferenças nas moléculas presentes no secretoma de cada cepa e/ou nos seus efeitos sobre os macrófagos, aumentando diferencialmente sua permissividade ao estabelecimento da infecção.

De fato, neste trabalho identificamos proteínas cuja abundância foi significativamente diferente no secretoma de cada cepa. Observamos um grupo de proteínas cuja abundância foi diminuída na secreção da cepa disseminada em comparação à cutânea, ou seja, estão aumentadas na cepa cutânea localizada. Estas proteínas estão envolvidas em **metabolismo de nucleotídeos fosfato** (*nucleoside diphosphate kinase*); **síntese de proteínas** (*60S acidic ribosomal protein P2*, *40S ribosomal protein S12*), **chaperonas** (*Heat shock protein*), **metabolismo de**

aminoácidos (*S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase, adenosylhomocysteinase*), **ligação de nucleotídeos** (*splicing factor ptrs1-like protein*), **proteólise** (*dihydrolipoyl dehydrogenase, GP63*), e **ligação de cálcio** (*calmodulin*), entre outras.

A enzima *nucleoside diphosphate kinase* (NDK) catalisa a transferência de grupos fosfato para diferentes nucleosídeos difosfatos, mantendo níveis apropriados de nucleosídeos trifosfatos na célula (163). Esta proteína foi identificada na secreção de *L. (L.) amazonensis* e foi capaz de promover a redução de ATP extracelular (254). A ligação de ATP extracelular ao receptor P2X7 de macrófagos e outras células induz a expressão da iNOS e posterior lise celular por apoptose e, portanto, um acúmulo de NDK no sobrenadante evitaria a lise de macrófagos mediada por ATP, preservando a integridade das células (254, 255). A diminuição dessa proteína na secreção da cepa disseminada pode indicar uma reduzida captação de ATP extracelular, que pode contribuir para o aumento da apoptose de células do hospedeiro nos momentos iniciais da infecção, garantido um aumento no recrutamento de outras células para o local de infecção e favorecendo a infecção de um maior número de células e disseminação do parasito.

A proteína dihidrolipoil desidrogenase (DLD) poderia exercer uma função não convencional como protease, de acordo com o banco de proteínas multitarefa (185, 256). Ao analisar, na rede de interação, os processos biológicos que esta proteína pode afetar, encontramos que a DLD tem 20 interações diretas com outras proteínas, entre as quais destacamos a observada com a *dipeptidyl-peptidase III* (DPP3) que, ao contrário da DLD, está aumentada na secreção da cepa disseminada, indicando que a diminuição de uma delas sinaliza para o aumento da outra, ou vice-versa. Esta observação pode indicar um balanço muito fino entre as abundância de peptidases ativas secretadas pelo parasito; o fato de ser diferencial entre as cepas pode sugerir papéis diferentes durante a infecção, ainda não esclarecidos.

A metalopeptidase GP63 também foi diminuída na secreção da cepa disseminada quando comparado com a cepa cutânea. Este resultado é intrigante visto que tem sido demonstrado que GP63 secretada pode ser internalizada por macrófagos, ativando diferentes tirosina fosfatases, tais como PTP, SHP-1, PTP1B (*protein tyrosine phosphatase 1B*) e TCPTP (*protein tyrosine phosphatase T cell phosphatase*), que induzem a inativação do macrófago (231), favorecendo o estabelecimento do parasito. Se por uma parte esta proteína poderia favorecer o estabelecimento da cepa cutânea, por outra parte sua diminuição na cepa

disseminada pode indicar a existência de mecanismos alternativos de desativação do macrófago nesta cepa, como por exemplo aqueles mediados pela proteína EEF1A (167, 219, 257-261). Adicionalmente, já que a GP63 pertence a uma extensa família gênica composta por mais de 30 membros em *L. (V.) braziliensis*, com potenciais funções diferentes (262), poderia ser sugerido que a proteína identificada desempenha outros papéis diferentes àquele descrito para a proteína identificada em *L. (L.) major* (231).

A proteína ribossomal 60S P2, diminuída na secreção da cepa disseminada, e que também foi observada diminuída ao nível de mRNA na cepa disseminada quando comparado com a cepa cutânea, é outra proteína que pode exercer várias funções: uma como proteína ribossomal (função canônica) e outra associada à captação de ferro intracelular (185, 263). Já que o ferro é essencial para a replicação intracelular de *Leishmania* (264), o aumento da expressão de moléculas capazes de captar ferro pelo parasito pode favorecer a sua proliferação no interior da célula. Contudo, se o sequestro de ferro extracelular potencialmente ocorre ou não, precisa ser demonstrado nestes parasitos. Além disso, assumindo que esta seja a função que a proteína exerce no meio extracelular, a diminuição da sua abundância não explicaria a persistência e proliferação da cepa disseminada. Pelo contrario, beneficiaria o estabelecimento da infecção da cepa cutânea. Não obstante, poderia ser sugerido que a diminuição na captação de ferro seja uma forma “silenciosa” de invadir as células hospedeiras, pois não alertaria os macrófagos para a superexpressão de uma serie de transportadores de ferro que rapidamente sequestram o metal disponível, limitando a proliferação do parasito (264, 265). Também tem sido observado que condições limitadas de ferro induzem a diferenciação de *Leishmania* (27), o que nos leva a especular que a cepa disseminada possa ter a sua diferenciação favorecida.

Visto a função imunomodulatória que as HSP apresentam (216) (discutida anteriormente), é possível sugerir que a diminuição da HSP - A4H9P0 na secreção da cepa disseminada, e cuja abundância foi também diminuída ao nível de transcritos, poderia modular negativamente importantes vias de tradução de sinais pró-inflamatórios, inativando macrófagos e inibindo a produção de TNF- α . Esta proposição é sustentada pelos níveis quase indetectáveis de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos pré-tratados ou não com secreção da cepa disseminada e infectados com esta cepa, em comparação à cepa cutânea. De fato, tanto a secreção da cepa cutânea, quanto o parasito *per se*, foram capazes de

estimular altos níveis de TNF- α , IL-6, IL-12, CCL2 em macrófagos murinos, indicando uma ativação apropriada das células para fazer frente à infecção. Ao mesmo tempo esta cepa foi capaz de suscitar a secreção de IL-10, o que poderia indicar um equilíbrio na resposta imune induzida por esta cepa, que redundaria no desfecho auto-resolutivo. De outra parte, nem a secreção da cepa disseminada, nem o parasito *per se* puderam ativar essa resposta pró-inflamatória *in vitro*, o que sugere uma desativação do macrófago por parte desta cepa e de suas proteínas secretadas, que favoreceria sua proliferação, diferenciação e disseminação.

Observamos também que a cepa disseminada apresentou aumento na abundância de proteínas **envolvidas em metabolismo de aminoácidos** (*aspartate aminotransferase*, *tyrosine aminotransferase*), **síntese de proteínas** (*40S ribosomal protein S3*, *elongation factor 1-alpha*), **resposta ao estresse** (*trypanothione reductase*, *T-complex protein 1, eta subunit*, *glucose-regulated protein 78*, *T-complex protein 1, theta subunit*), **proteólise** (*Dipeptidyl-peptidase III – DPP3*), **sinalização** (*14-3-3 protein*, *elongation factor 1-alpha*-função “moonlight”), além de três proteínas anotadas como não caracterizadas, uma das quais apresentou um domínio de tioredoxina. O aumento na abundância destas proteínas na secreção da cepa disseminada pode favorecer o estabelecimento da infecção, a persistência do parasito e a sua disseminação, graças ao aumento na eficiência de vários processos em comparação à cepa cutânea:

- (i) maior eficiência na desintoxicação de radicais tóxicos, mediada principalmente pelo aumento na tripanotona redutase, cuja abundância aumentada, em conjunto com as outras enzimas que respondem frente a este estresse, incrementaria sua resistência ao estresse oxidativo. De fato, foi demonstrado que a interrupção do gene da tripanotona redutase diminui a infectividade de *Leishmania* e sua capacidade de sobreviver dentro do macrófago (266, 267). Além disso, foi demonstrado que a resistência ao estresse oxidativo está associada com a metástase na leishmaniose mucocutânea causada por cepas de *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* (51);
- (ii) maior eficiência na diferenciação e proliferação, mediada por GRP78, como já foi discutido anteriormente, e a qual implicaria em uma rápida adaptação ao ambiente fagolisossomal. Esta maior eficiência na diferenciação estaria acompanhada por um aumento na síntese de proteínas. Ademais, a GRP78 é secretada por células cancerígenas (220), e pode favorecer disseminação

metastática (220-222); sua interação com mais de 150 interatores na rede, indica que esta proteína afeta múltiplos processos. A maior eficiência na proliferação também poderia ser mediada pelo aumento na *aspartate aminotransferase*, GOT1, a qual regenera metionina a partir da metiltioadenosina (268). A síntese de poliaminas é fundamental para a rápida proliferação celular e é um processo altamente explorado por parasitos e células cancerosas (268, 269). O aumento desta proteína na secreção da cepa disseminada poderia favorecer a rápida multiplicação do parasito nas primeiras etapas de infecção na célula hospedeira, garantindo o estabelecimento e disseminação da infecção (268, 269). Ademais, o aumento de dipeptidyl-peptidase III pode favorecer a proliferação do parasito pelo fornecimento de nutrientes, produto de proteólise, necessários para a sobrevivência dentro da célula hospedeira.

- (iii) maior eficiência no “silenciamento” do macrófago, mediado por peptidases que podem clivar e ativar fosfatases, as quais inibem a cascata de sinalização encarregada de ativar a produção de NO, permitindo assim a proliferação do parasito. O fator de alongação 1-alfa (EEF1A), o qual catalisa a ligação de aminoacil-tRNAs para o sitio A do ribossomo durante o alongamento da cadeia peptídica, desempenha também uma função não canônica de peptidase na secreção de *L. (L.) donovani*. Em sua função proteolítica, EEF1A desativa indiretamente o macrófago mediante a ativação de SHP-1 (Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase-1), uma tirosina fosfatase que afeta negativamente as vias via JACK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) e MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) resultando na desativação do macrófago e diminuição da produção de NO (167, 219, 257-261). Além disso, EEF1A foi a segunda proteína que apresentou maior complexidade em relação ao número de interações diretas (138) o que sugere que ela regula um grande número de processos e que o aumento na sua abundancia favoreceria esses processos de fato. Adicionalmente, observamos que a rede de interações da peptidase DPP3 (A0A088RIB2), encontrada aumentada na secreção da cepa disseminada, afeta processos importantes incluindo ativação da via MAPK (UBC), morte celular (NDRG1) e regulação do processo de apoptose (TNFAIP8);

(iv) maior eficiência na disseminação, mediada por GRP78 (discutida acima) e pela proteína ribossomal S3 (RPS3) a qual exerce um papel na síntese de proteínas, outro no reparo de DNA (185, 270, 271), e um terceiro na disseminação de tumores malignos (272, 273). A secreção aumentada da RPS3 pela cepa disseminada poderia estar associada ao processo de disseminação destes parasitos. Contudo, o mecanismo pelo qual RPS3 pode favorecer a disseminação ainda precisa ser esclarecido.

É evidente que o grupo enriquecido de proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo foi abundante apenas na cepa disseminada, sugerindo que este processo seja crucial para o curso dos outros processos relacionados à disseminação. A maior eficiência na desintoxicação e na diferenciação pode favorecer a infecção e proliferação do parasito. Esta afirmação é suportada pela observação de que macrófagos pré-tratados com secreção da cepa disseminada apresentam um maior índice de infecção que aqueles pré-tratados com a cepa cutânea. Além disso, uma melhor eficiência no “silenciamento” do macrófago favoreceria ainda mais o estabelecimento da infecção e a persistência. Este “silenciamento” também pode ser corroborado pela pouca resposta inflamatória elicitada em macrófagos pré-tratados com a secreção desta cepa, e pelos parasitos *per se*, em comparação com os níveis observados para os macrófagos pré-tratados ou não com a o secretoma da cepa cutânea. Desta forma, nossos resultados corroboram a importância das moléculas secretadas pelos parasitos no processo de infecção e patogenicidade de cepas de associadas a distintas manifestações clínicas da LTA.

Leishmania é capaz de fugir da ação microbida do macrófago e consegue sobreviver e se multiplicar dentro do fagolisossoma (167, 274). De acordo com esta observação, nossos dados mostram que as moléculas secretadas têm um importante papel protetor nas primeiras etapas de infecção. Observamos, por exemplo, que há uma diferença significativa entre a percentagem de infecção de macrófagos pré-estimulados com secreção de *Leishmania* frente ao grupo controle. Em geral é observado que a cepa disseminada em comparação com a cepa cutânea, apresenta porcentagens de infecção significativamente maiores frente ao controle, e maiores números de amastigotas por célula ao longo do experimento, que se evidenciam em maiores índices de infecção ao longo do tempo quando comparado com a cepa cutânea. Embora ambas as cepas possam infectar com

êxito os macrófagos, a maneira de ativação dos mesmos nas primeiras etapas de interação pode determinar o desfecho diferencial da infecção em longo prazo. Por essa razão, medimos aqui os níveis de citocinas pró-inflamatórias secretadas pelos macrófagos infectados com cada uma das cepas e que tinham sido pré-tratados ou não com a secreção homóloga.

O paradigma da resposta Th1/Th2 frente à infecção com *Leishmania* descreve que a resposta do tipo Th1 contribui para ativação do macrófago, mediada por IFN- γ , com posterior controle e resolução da doença (274). É interessante notar que nos macrófagos infectados com a cepa cutânea, foram detectados níveis de IFN- γ , indicando que moléculas expressas por esta cepa foram capazes de induzir a secreção desta citocina. Tem sido observado que macrófagos estimulados com IL12/IL18 secretam IFN- γ (275-277). Contudo, as moléculas do parasito que estimularam essa secreção ainda estão por ser identificadas.

A resistência à infecção ou a capacidade de resolução das lesões está associada à expressão de IL-12, e TNF- α , com produção de NO (278, 279). Observamos aqui que há um aumento significativo nos níveis de TNF- α tanto nas células controle quanto nos macrófagos pré-estimulados com a secreção da cepa cutânea, em comparação aos macrófagos pré-estimulados com a secreção da cepa disseminada e/ou infectados com ela, os quais apresentaram níveis de TNF- α 4-7X vezes menores. Estes achados sugerem que a secreção da cepa disseminada subverte de alguma forma a ativação da resposta pró-inflamatória que controla a infecção e leva a autorresolução da lesão causada pela cepa cutânea. Esta subversão garantiria a persistência e posterior disseminação do parasito. Estes resultados também estariam de acordo com as observações de que TNF- α é fundamental para a formação do granuloma responsável pelo controle da proliferação do parasito e resolução da doença (89). O aumento de TNF- α induzido pela cepa cutânea pode sinalizar o caminho para o recrutamento apropriado de células ao local da infecção e posterior formação de granuloma, levando à resolução da infecção com esta cepa, em contraste com a infecção com a cepa disseminada, incapaz de induzir este tipo de resposta. Similarmente, os níveis de IL-6 foram mais elevados em macrófagos pré-tratados ou não com a secreção da cepa cutânea e infectados do que nos macrófagos infectados com a cepa disseminada (pré-tratados ou não). Estudos seminais demonstraram que IL-6 é altamente expresso em lesões cutâneas localizadas de pacientes (280) e, mais recentemente, foi demonstrado que IL-6 regula a resposta pró-inflamatória do tipo 1 e que indivíduos cujos macrófagos

apresentam baixos níveis de IL-6 apresentam um risco maior de desenvolver a forma mucocutânea da doença, que implica disseminação do parasito (281).

Interessantemente, foi possível analisar a secreção de CCL2, uma proteína quimiotática de macrófago (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*) que regula o recrutamento de macrófagos, monócitos, e outras células importantes para a resposta celular contra *Leishmania* (282-284). Esta quimiocina encontra-se em alta concentração em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (285). Similar ao observado com TNF- α e IL6, a quantificação de CCL2 mostrou que macrófagos pré-tratados ou não com a secreção e infectados com a cepa cutânea apresentam níveis significativamente mais elevados desta quimiocina do que macrófagos infectados com a cepa disseminada (pré-tratados ou não). Tem sido descrito que MCP-1 junto com proteína inflamatória de macrófago (MIP-1 α) desvia a resposta imune para uma resposta Th1 e suprime a resposta Th2, em modelo camundongo BALB/c infectado com *L. (L.) donovani*, mediante a indução da secreção de IL-12 e inibição da produção de IL-10 em macrófagos infectados (286). Esta citocina, em conjunto com o TNF- α , poderiam favorecer a migração celular para o local da infecção ativando apropriadamente a resposta celular efetora, estimulando a formação de granuloma e controlando assim a infecção com a cepa cutânea. Desta forma nossos dados estão de acordo com as observações prévias de que pacientes com LC localizada apresentam uma resposta pró-inflamatória que favorece a resolução da infecção. Em contraste, a cepa disseminada não é capaz de suscitar essa resposta, ou tem mecanismos para evadir essa ativação, favorecendo a instalação da infecção, a proliferação do parasito e sua persistência no hospedeiro, requisitos indispensáveis para a disseminação metastática. Identificamos também aqui as moléculas que potencialmente medeiam esta ativação/desativação em cada cepa, particularmente no secretoma, e apontamos algumas moléculas que poderiam estar potencialmente associadas ao processo metastático. Estudos adicionais do secretoma de outras cepas precisam ser feitos para validar a associação dessas moléculas com o fenótipo metastático. Além disso, estudos funcionais serão necessários para demonstrar o papel de algumas dessas moléculas na disseminação do parasito.

7 CONCLUSÕES

- O secretoma de *L. (V.) braziliensis*, nas condições experimentais aqui observadas, é composto por pelo menos 252 proteínas associadas, principalmente, às atividades catalíticas; a maioria delas parecem ser exportadas por mecanismos não convencionais de secreção;
- *L. (V.) braziliensis* secreta proteínas que têm funções diferentes àquelas canônicas descritas anteriormente, tornando as proteínas multitarefa um alvo interessante de estudo para conhecer a sua função no meio extracelular e seu papel no estabelecimento da infecção;
- Os secretomas da cepa disseminada e da cepa cutânea apresentam diferenças significativas na abundância de proteínas secretadas para o meio extracelular;
- Macrófagos peritoneais respondem diferencialmente ao estímulo de secreção com cada cepa de *L. (V.) braziliensis in vitro*, demonstrando que a secreção desenvolve um papel chave nas primeiras etapas de infecção.
- As proteínas diferencialmente abundantes entre as cepas ativam diferencialmente os macrófagos peritoneais murinos *in vitro*, observando-se uma ativação de resposta pró-inflamatória induzida pela secreção e/ou infecção com a cepa cutânea, a qual não foi possível observar nos macrófagos tratado e/ou infectados com a cepa disseminada.
- A subversão da resposta pró-inflamatória por parte da cepa disseminada pode favorecer o estabelecimento da infecção com esta cepa, sua proliferação e persistência na célula hospedeira;
- Várias das proteínas aumentadas na secreção da cepa disseminada poderiam ter um papel na disseminação metastática do parasito, deduzido por similaridade com o papel desenvolvido por proteínas ortólogas em humanos

8 PERSPECTIVAS

- Validar os dados proteômicos diferenciais usando *parallel reaction monitoring* como estratégia quantitativa de alta resolução.
- Realizar estudos proteômicos quantitativos das proteínas secretadas pelas culturas de macrófago e dos macrófagos *per se* após tratamento com secreção e posterior infecção com as duas cepas de *L. (V.) braziliensis*.
- Realizar estudos de localização e função das proteínas encontradas diferencialmente expresas para elucidar a possível função nas células hospedeiras.
- Avaliar o efeito da secreção de *L. (V.) braziliensis* das duas cepas *in vivo* em camundongos BALB/c para posterior infecção com promastigotas das cepas envolvidas nos fenótipos polares.
- Caracterizar quantitativamente o secretoma de amastigotas das duas cepas para avaliar o efeito da secreção da forma intracelular na infecção do parasito em macrófagos.
- Caracterizar secretomas de outras cepas envolvidas em fenótipos metastáticos e comparar com os candidatos de disseminação encontrados nesta tese.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G, Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*. 2000;16(4):142-4.
2. Schonian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology*. 2010;26(10):466-9.
3. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. *The Leishmaniases in Biology and Medicine*. 1987;1:1-120.
4. Momen H, Cupolillo E. Speculations on the Origin and Evolution of the Genus *Leishmania*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000;95(4):583-8.
5. McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunological Reviews*. 2004;201:206-24.
6. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*. 2012;7(5).
7. Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology*. 2012;28(8):335-44.
8. Blackwell JM, Ezekowitz RAB, Roberts MB, Channon JY, Sim RB, Gordon S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *Journal of Experimental Medicine*. 1985;162(1):324-31.
9. Da Silva RP, Hall BF, Joiner KA, Sacks DL. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania* major metacyclic promastigotes to human macrophages. *Journal of Immunology*. 1989;143(2):617-22.
10. Guy RA, Belosevic M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania* major amastigotes into macrophages. *Infection and Immunity*. 1993;61(4):1553-8.
11. Mosser DM, Edelson PJ. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *Journal of Immunology*. 1985;135(4):2785-9.
12. Wyler DJ, Sypek JP, McDonald JA. In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: Possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infection and Immunity*. 1985;49(2):305-11.
13. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*. 2007;37(10):1097-106.
14. Handman E, Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*. 2002;18(8):332-4.
15. Real F, Florentino PTV, Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Veras PST, Goto H, et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cellular Microbiology*. 2014;16(10):1549-64.
16. Bifeld E, Clos J. The genetics of *Leishmania* virulence. *Medical Microbiology and Immunology*. 2015;204(6):619-34.
17. Da Silva IA, Jr., Morato CI, Quixabeira VBL, De Araújo Pereira LI, Dorta ML, De Oliveira MAP, et al. In Vitro Metacyclogenesis of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages. *BioMed Research International*. 2015;2015.

18. Zakai HA, Chance ML, Bates PA. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Parasitology*. 1998;116(4):305-9.
19. McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2013;107(1):7-14.
20. Podinovskaia M, Descoteaux A. *Leishmania* and the macrophage: A multifaceted interaction. *Future Microbiology*. 2015;10(1):111-29.
21. Gluenz E, Ginger ML, McKean PG. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Current Opinion in Microbiology*. 2010;13(4):473-9.
22. Laskay T, Van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*. 2003;11(5):210-4.
23. Aga E, Katschinski DM, Van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of Immunology*. 2002;169(2):898-905.
24. Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of Immunology*. 2004;173(11):6521-5.
25. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 2008;321(5891):970-4.
26. McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PLoS Pathogens*. 2013;9(1).
27. Mittra B, Andrews NW. IRONY OF FATE: Role of iron-mediated ROS in *Leishmania* differentiation. *Trends in Parasitology*. 2013;29(10):489-96.
28. Mittra B, Cortez M, Haydock A, Ramasamy G, Myler PJ, Andrews NW. Iron uptake controls the generation of leishmania infective forms through regulation of ROS levels. *Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(2):401-16.
29. Recalcati S, Locati M, Gammella E, Invernizzi P, Cairo G. Iron levels in polarized macrophages: Regulation of immunity and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2012;11(12):883-9.
30. Recalcati S, Locati M, Marini A, Santambrogio P, Zaninotto F, De Pizzol M, et al. Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *European Journal of Immunology*. 2010;40(3):824-35.
31. de Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2015;16(2):99-109.
32. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*. 2006;22(12):552-7.
33. Alves CF, Figueiredo MM, Souza CC, Machado-Coelho GLL, Melo MN, Tafuri WL, et al. American Tegumentary Leishmaniasis: Effectiveness of an Immunohistochemical Protocol for the Detection of *Leishmania* in Skin. *PLoS ONE*. 2013;8(5).
34. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(8):604-15.
35. Faber WR, Hay RJ, Naafs B. *Imported Skin Diseases: Second Edition*. John Wiley and Sons; 2012.
36. Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;86(3):426-33.

37. Lessa MM, Lessa HA, Castro TWN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, et al. Mucosal leishmaniasis: Epidemiological and clinical aspects. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2007;73(6):843-7.
38. Costa JML, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: A report of eight cases. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1986;89(6):319-23.
39. Santrich C, Segura I, Arias AL, Saravia NG. Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1990;42(1):51-5.
40. Weigle K, Saravia NG. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in new world cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*. 1996;14(5):433-50.
41. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("spundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1986;80(6):859-76.
42. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496):1561-77.
43. Osorio LE, Castillo CM, Ochoa MT. Mucosal Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: Clinical characteristics. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;59(1):49-52.
44. Zangger H, Ronet C, Desponds C, Kuhlmann FM, Robinson J, Hartley MA, et al. Detection of *Leishmania* RNA Virus in *Leishmania* Parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(1).
45. Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O. *Leishmania (Viannia)*: Genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Experimental Parasitology*. 2004;108(1-2):59-66.
46. Ives A, Ronet C, Prevel F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, et al. *Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science*. 2011;331(6018):775-8.
47. Tarr PI, Aline Jr RF, Smiley BL, Scholler J, Keithly J, Stuart K. LR1: A candidate RNA virus of *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(24):9572-275.
48. Adai V, Lye LF, Akopyants NS, Zimic M, Llanos-Cuentas A, Garcia L, et al. Association of the Endobiont Double-Stranded RNA Virus LRV1 With Treatment Failure for Human Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. *J Infect Dis*. 2016;213(1):112-21.
49. Ito MM, Catanhêde LM, Katsuragawa TH, da Silva Junior CF, Camargo LMA, Mattos RDG, et al. Correlation between presence of *Leishmania* RNA virus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniasis. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2015;81(5):533-40.
50. de Oliveira Ramos Pereira L, Maretti-Mira AC, Rodrigues KM, Lima RB, de Oliveira-Neto MP, Cupolillo E, et al. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania* RNA virus 1 infection in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108(5):665-7.
51. Acestor N, Masina S, Ives A, Walker J, Saravia NG, Fasel N. Resistance to oxidative stress is associated with metastasis in mucocutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. 2006;194(8):1160-7.
52. Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, et al. Cytotoxic T Cells Mediate Pathology and Metastasis in Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Pathogens*. 2013;9(7).
53. Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MSF, Mortara RA, Brodskyn CI, et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous

- leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *Journal of Infectious Diseases*. 2006;193(9):1313-22.
54. De Oliveira CI, Brodskyn CI. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Frontiers in Immunology*. 2012;3(JUN).
 55. Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *Journal of Immunology*. 2009;183(12):8088-98.
 56. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*. 2007;5(11):873-82.
 57. Jain K, Jain NK. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *Journal of Immunological Methods*. 2015;422:1-12.
 58. Murray HW, Mitchell-Flack M, Taylor GA, Ma X. IFN- γ -induced macrophage antileishmanial mechanisms in mice: A role for immunity-related GTPases, *Irgm1* and *Irgm3*, in *Leishmania donovani* infection in the liver. *Experimental Parasitology*. 2015;157:103-9.
 59. Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: Self-renewal of differentiated macrophages. *Science*. 2013;342(6161).
 60. Duque GA, Descoteaux A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*. 2014;5(OCT).
 61. Huber C, Stingl G. Macrophages in the regulation of immunity. *Hamatologie und Bluttransfusion*. 1981;27:31-7.
 62. Unanue ER, Beller DI, Calderon J, Kiely JM, Stadecker MJ. Regulation of immunity and inflammation by mediators from macrophages. *American Journal of Pathology*. 1976;85(2):465-78.
 63. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819-26.
 64. Liew FY, Li Y, Millott S. Tumour necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. II. TNF- α -induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*. 1990;71(4):556-9.
 65. Liew FY, Parkinson C, Millott S, Severn A, Carrier M. Tumour necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. I. TNF- α mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology*. 1990;69(4):570-3.
 66. Classen A, Lloberas J, Celada A. Macrophage activation: classical versus alternative. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2009;531:29-43.
 67. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;73(2):209-12.
 68. Lambert U, Silverman JM, Nandan D, Robert McMaster W, Clos J, Foster LJ, et al. Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012;91(6):887-99.
 69. Osorio EY, Zhao W, Espitia C, Saldarriaga O, Hawel L, Byus CV, et al. Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. *PLoS Pathogens*. 2012;8(1).
 70. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(11):845-58.
 71. Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *Journal of Experimental Medicine*. 1988;168(5):1675-84.
 72. Sadick MD, Heinzl FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, Locksley RM. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T

- cell-dependent, interferon γ -independent mechanism. *Journal of Experimental Medicine*. 1990;171(1):115-27.
73. Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1993;87(4):444-8.
74. De Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity*. 2005;73(9):5827-34.
75. Navas A, Vargas DA, Freudzon M, McMahon-Pratt D, Saravia NG, Gómez MA. Chronicity of dermal leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis* is associated with parasite-mediated induction of chemokine gene expression. *Infection and Immunity*. 2014;82(7):2872-80.
76. Elso CM, Roberts LJ, Smyth GK, Thomson RJ, Baldwin TM, Foote SJ, et al. Leishmaniasis host response loci (*Imr1-3*) modify disease severity through a Th1/Th2-independent pathway. *Genes and Immunity*. 2004;5(2):93-100.
77. Soong L, Henard CA, Melby PC. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Seminars in Immunopathology*. 2012;34(6):735-51.
78. Tacchini-Cottier F, Weinkopff T, Launois P. Does T helper differentiation correlate with resistance or susceptibility to infection with *L. Major*? Some insights from the murine model. *Frontiers in Immunology*. 2012;3(FEB).
79. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Paes de Oliveira-Neto M, De Brito MEF, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(7):3126-32.
80. Martin-Blondel G, Iriart X, El Baidouri F, Simon S, Mills D, Demar M, et al. Outbreak of *Leishmania braziliensis* cutaneous Leishmaniasis, Saul, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases*. 2015;21(5):892-4.
81. Olalla HR, Velez LN, Kato H, Hashiguchi K, Cáceres AG, Gomez EA, et al. An analysis of reported cases of leishmaniasis in the southern Ecuadorian Amazon region, 1986-2012. *Acta Tropica*. 2015;146:119-26.
82. Shender LA, De Los Santos M, Montgomery JM, Conrad PA, Gherzi BM, Razuri H, et al. Native rodent species are unlikely sources of infection for *Leishmania (Viannia) braziliensis* along the Transoceanic Highway in Madre de Dios, Peru. *PLoS One*. 2014;9(7).
83. Queiroz A, Sousa R, Heine C, Cardoso M, Guimarães LH, Machado PRL, et al. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(12):4028-34.
84. Schriefer A, Guimarães LH, Machado PRL, Lessa M, Lessa HA, Lago E, et al. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2009;15(6):871-6.
85. Cuervo P, Sabóia-Vahia L, Costa Silva-Filho F, Fernandes O, Cupolillo E, De Jesus JB. A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Parasitology*. 2006;132(2):177-85.
86. Cuervo P, Santos ALS, Alves CR, Menezes GC, Silva BA, Britto C, et al. Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Acta Tropica*. 2008;106(3):143-8.

87. Leopoldo PTG, Machado PRL, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, Ribeiro de Jesus A, et al. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infectious Diseases*. 2006;6.
88. Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: Balancing pathology and protection. *Parasite Immunology*. 2014;36(8):367-76.
89. Souza-Lemos C, De-Campos SN, Teva A, Côrte-Real S, Fonseca EC, Porrozzi R, et al. Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. *Journal of Pathology*. 2008;216(3):375-86.
90. de-Campos SN, Souza-Lemos C, Teva A, Porrozzi R, Grimaldi G. Systemic and compartmentalised immune responses in a *Leishmania braziliensis*-macaque model of self-healing cutaneous leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2010;137(1-2):149-54.
91. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: A new and emerging form of leishmaniasis observed in Northeastern Brazil. *Journal of Infectious Diseases*. 2002;186(12):1829-34.
92. Vernal S, De Paula NA, Gomes CM, Roselino AM. Disseminated Leishmaniasis by *Leishmania viannia* Subgenus: A Series of 18 Cases in Southeastern Brazil. *Open Forum Infectious Diseases*. 2016;3(1):ofv184.
93. Vélez ID, Jiménez A, Vásquez D, Robledo SM. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: Report of 27 Cases. *Case Reports in Dermatology*. 2015 Sep-Dec;7(3):275-86.
94. Calvopina M, Gomez EA, Uezato H, Kato H, Nonaka S, Hashiguchi Y. Atypical clinical variants in new world cutaneous leishmaniasis: Disseminated, erysipeloid, and recidiva cutis due to *Leishmania (V.) panamensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;73(2):281-4.
95. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(3):239-51.
96. Souza-Lemos C, de-Campos SN, Teva A, Porrozzi R, Grimaldi Jr G. In situ characterization of the granulomatous immune response with time in nonhealing lesional skin of *Leishmania braziliensis*-infected rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011;142(3-4):147-55.
97. Alves-Ferreira EVC, Toledo JS, De Oliveira AHC, Ferreira TR, Ruy PC, Pinzan CF, et al. Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal *Leishmania braziliensis* Isolates from the Same Patient. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(9).
98. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 2005;309(5733):436-42.
99. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*. 2007;39(7):839-47.
100. Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research*. 2011;21(12):2129-42.
101. Downing T, Imamura H, Decuypere S, Clark TG, Coombs GH, Cotton JA, et al. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates

- provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Research*. 2011;21(12):2143-56.
102. Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2007;152(1):35-46.
103. Cantacessi C, Dantas-Torres F, Nolan MJ, Otranto D. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends in Parasitology*. 2015;31(3):100-8.
104. Lye LF, Owens K, Shi H, Murta SMF, Vieira AC, Turco SJ, et al. Retention and Loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathogens*. 2010;6(10).
105. Depledge DP, Evans KJ, Ivans AC, Aziz N, Maroof A, Kaye PM, et al. Comparative expression profiling of *Leishmania*: Modulation in gene expression between species and in different host genetic backgrounds. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2009;3(7).
106. Aduai V, Castillo D, Zimic M, Gutierrez A, Decuypere S, Vanaerschot M, et al. Comparative gene expression analysis throughout the life cycle of *Leishmania braziliensis*: Diversity of expression profiles among clinical isolates. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(5).
107. Rezende AM, Folador EL, Resende DdM, Ruiz JC. Computational Prediction of Protein-Protein Interactions in *Leishmania* Predicted Proteomes. *PLoS ONE*. 2012;7(12).
108. Cuervo P, Domont GB, De Jesus JB. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics*. 2010;73(5):845-67.
109. de Jesus JB, Mesquita-Rodrigues C, Cuervo P. Proteomics advances in the study of *Leishmania* parasites and leishmaniasis. *Sub-Cellular Biochemistry*. 2014;74:323-49.
110. Cuervo P, de Jesus JB, Junqueira M, Mendonça-Lima L, González LJ, Betancourt L, et al. Proteome analysis of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2007;154(1):6-21.
111. Góngora R, Acestor N, Quadroni M, Fasel N, Saravia NG, Walker J. Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. *Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2003;23(2):153-60.
112. Walker J, Vasquez JJ, Gomez MA, Drummelsmith J, Burchmore R, Girard I, et al. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2006;147(1):64-73.
113. Walker J, Gongora R, Vasquez JJ, Drummelsmith J, Burchmore R, Roy G, et al. Discovery of factors linked to antimony resistance in *Leishmania panamensis* through differential proteome analysis. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2012;183(2):166-76.
114. Peláez RG, Muskus CE, Cuervo P, Marín-Villa M. Differential expression of proteins in *leishmania* (*viannia*) *panamensis* associated with mechanisms of resistance to meglumine antimoniate. *Biomedica*. 2012;32(3):418-29.
115. Walker J, Acestor N, Gongora R, Quadroni M, Segura I, Fasel N, et al. Comparative protein profiling identifies elongation factor-1 β and trypanothione peroxidase as factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2006;145(2):254-64.

116. Cuervo P, De Jesus JB, Sabóia-Vahia L, Mendonça-Lima L, Domont GB, Cupolillo E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *Journal of Proteomics*. 2009;73(1):79-92.
117. Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome biology*. 2008;9(2).
118. Hassani K, Antoniak E, Jardim A, Olivier M. Temperature-induced protein secretion by *leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. *PLoS ONE*. 2011;6(5).
119. de Souza Moreira D, Pescher P, Laurent C, Lenormand P, Spath GF, Murta SMF. Phosphoproteomic analysis of wild-type and antimony-resistant *Leishmania braziliensis* lines by 2D-DIGE technology. *Proteomics*. 2015;15(17):2999-3019.
120. Yates JI JR. Mass spectral analysis in proteomics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*; 2004. p. 297-316.
121. Lambert JP, Ethier M, Smith JC, Figeys D. Proteomics: From gel based to gel free. *Analytical Chemistry*. 2005;77(12):3771-87.
122. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006;312(5771):212-7.
123. Ong SE, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature chemical biology*. 2005;1(5):252-62.
124. Stemmann O, Zou H, Gerber SA, Gygi SP, Kirschner MW. Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell*. 2001;107(6):715-26.
125. Yao X, Freas A, Ramirez J, Demirev PA, Fenselau C. Proteolytic ¹⁸O labeling for comparative proteomics: Model studies with two serotypes of adenovirus. *Analytical Chemistry*. 2001;73(13):2836-42.
126. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*. 1999;17(10):994-9.
127. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2002;1(5):376-86.
128. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: Approaches, advances, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*; 2009. p. 49-79.
129. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2004;3(12):1154-69.
130. Butler GS, Overall CM. Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009;8(12):935-48.
131. Piatigorsky J. Gene sharing in lens and cornea: Facts and implications. *Progress in Retinal and Eye Research*. 1998;17(2):145-74.
132. Hernández S, Ferragut G, Amela I, Perez-Pons J, Piñol J, Mozo-Villarias A, et al. MultitaskProtDB: A database of multitasking proteins. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(D1):D517-D20.
133. Jeffery CJ. Mass spectrometry and the search for moonlighting proteins. *Mass Spectrometry Reviews*. 2005;24(6):772-82.
134. Jeffery CJ. Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 1999;24(1):8-11.

135. Moore BD. Bifunctional and moonlighting enzymes: Lighting the way to regulatory control. *Trends in Plant Science*. 2004;9(5):221-8.
136. Sriram G, Martinez JA, McCabe ERB, Liao JC, Dipple KM. Single-gene disorders: What role could moonlighting enzymes play? *American Journal of Human Genetics*. 2005;76(6):911-24.
137. Gancedo C, Flores CL. Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2008;72(1):197-210.
138. Jeffery CJ. Molecular mechanisms for multitasking: Recent crystal structures of moonlighting proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 2004;14(6):663-8.
139. Huberts DHEW, van der Klei IJ. Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2010;1803(4):520-5.
140. Seelenmeyer C, Stegmayer C, Nickel W. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 and galectin-1 does not require shedding of plasma membrane-derived vesicles. *FEBS Letters*. 2008;582(9):1362-8.
141. Radisky DC, Stallings-Mann M, Hirai Y, Bissell MJ. Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10(3):228-34.
142. Collingridge PW, Brown RWB, Ginger ML. Moonlighting enzymes in parasitic protozoa. *Parasitology*. 2010;137(9):1467-75.
143. Henderson B, Martin AC. Protein moonlighting: a new factor in biology and medicine. *Biochem Soc Trans*. 2014(1470-8752 (Electronic)).
144. van Gestel J, Nowak MA, Tarnita CE. The Evolution of Cell-to-Cell Communication in a Sporulating Bacterium. *PLoS Computational Biology*. 2012;8(12).
145. Paltridge JL, Belle L, Khew-Goodall Y. The secretome in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2013;1834(11):2233-41.
146. Evans-Osses I, Reichembach LH, Ramirez MI. Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction. *Parasitology Research*. 2015;114(10):3567-75.
147. Mustafa SA, Hoheisel JD, Alhamdani MSS. Secretome profiling with antibody microarrays. *Molecular BioSystems*. 2011;7(6):1795-801.
148. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*. 2013;95(12):2196-211.
149. Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH, Bron S, Van Dijk JM. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: A genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000;64(3):515-47.
150. Ranganathan S, Garg G. Secretome: Clues into pathogen infection and clinical applications. *Genome Medicine*. 2009;1(11).
151. Hegde RS, Bernstein HD. The surprising complexity of signal sequences. *Trends in Biochemical Sciences*. 2006;31(10):563-71.
152. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 2013;200(4):373-83.
153. Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer-the emerging science of cellular 'debris'. *Seminars in Immunopathology*. 2011:1-13.
154. Prudovsky I, Tarantini F, Landriscina M, Neivandt D, Soldi R, Kirov A, et al. Secretion without Golgi. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2008;103(5):1327-43.
155. Nickel W, Seedorf M. Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*; 2008. p. 287-308.

156. Piper RC, Katzmann DJ. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*; 2007. p. 519-47.
157. Bates PA, Hermes I, Dwyer DM. *Leishmania donovani*: Immunochemical localization and secretory mechanism of soluble acid phosphatase. *Experimental Parasitology*. 1989;68(3):335-46.
158. Chang KP, McGwire BS. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 2002;1.
159. Yao C, Leidal KG, Brittingham A, Tarr DE, Donelson JE, Wilson ME. Biosynthesis of the major surface protease GP63 of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2002;121(1):119-28.
160. Jaffe CL, Dwyer DM. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. *Parasitology Research*. 2003;91(3):229-37.
161. Torrecilhas AC, Schumacher RI, Alves MJM, Colli W. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes and Infection*. 2012;14(15):1465-74.
162. Moradin N, Descoteaux A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2:121.
163. Braga MS, Neves LX, Campos JM, Roatt BM, De Oliveira Aguiar Soares RD, Braga SL, et al. Shotgun proteomics to unravel the complexity of the *Leishmania infantum* exoproteome and the relative abundance of its constituents. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2014;195(1):43-53.
164. Bayer-Santos E, Aguilar-Bonavides C, Rodrigues SP, Cordero EM, Marques AF, Varela-Ramirez A, et al. Proteomic analysis of *trypanosoma cruzi* secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *Journal of Proteome Research*. 2013;12(2):883-97.
165. Silverman JM, Clos J, De'Oliveira CC, Shirvani O, Fang Y, Wang C, et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *Journal of Cell Science*. 2010;123(6):842-52.
166. Silverman JM, Clos J, Horakova E, Wang AY, Wiesgigl M, Kelly I, et al. *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *Journal of Immunology*. 2010;185(9):5011-22.
167. Nandan D, Reiner NE. *Leishmania donovani* engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Clinical Immunology*. 2005;114(3 SPEC. ISS.):266-77.
168. Martinez JE, Travi BL, Valencia AZ, Saravia NG. Metastatic capability of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in golden hamsters. *Journal of Parasitology*. 1991;77(5):762-8.
169. Martinez JE, Valderrama L, Gama V, Leiby DA, Saravia NG. Clonal diversity in the expression and stability of the metastatic capability of *Leishmania guyanensis* in the golden hamster. *Journal of Parasitology*. 2000;86(4):792-9.
170. Carvalho PC, Fischer JSG, Xu T, Yates Iii JR, Barbosa VC. PatternLab: From mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2012(SUPPL.40).
171. Carvalho PC, Yates Iii JR, Barbosa VC. Analyzing shotgun proteomic data with patternlab for proteomics. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2010(SUPPL. 30):13..1-..5.
172. 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 Protocols*. 2016;11(1):102-17.

173. Carvalho PC, Fischer JSG, Xu T, Cociorva D, Balbuena TS, Valente RH, et al. Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. *Proteomics*. 2012;12(7):944-9.
174. Carvalho PC, Fischer JSG, Chen EI, Domont GB, Carvalho MGC, Degraeve WM, et al. GO Explorer: A gene-ontology tool to aid in the interpretation of shotgun proteomics data. *Proteome Science*. 2009;7.
175. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(D1):D222-D30.
176. Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*. 2011;8(10):785-6.
177. Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Von Heijne G, Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2004;17(4):349-56.
178. Bendtsen JD, Kiemer L, Fausboll A, Brunak S. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiology*. 2005;5.
179. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, Von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*. 2000;300(4):1005-16.
180. Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings / International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. 1998;6:175-82.
181. Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*. 2009;9(21):4997-5000.
182. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol*. 2015 Oct 3;2836(15):00542-2.
183. Carazzolle MF, De Carvalho LM, 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*. 2014;9(6).
184. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*. 2003;13(11):2498-504.
185. Hernández S, Ferragut G, Amela I, Perez-Pons J, Piñol J, Mozo-Villarias A, et al. MultitaskProtDB: A database of multitasking proteins. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(D1):D517-D20.
186. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 1997;25(17):3389-402.
187. Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schaffer AA, et al. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS Journal*. 2005;272(20):5101-9.
188. Willems E, Leyns L, Vandesompele J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Analytical Biochemistry*. 2008;379(1):127-9.
189. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 2009;55(4):611-22.
190. Cunha J, Carrillo E, Sánchez C, Cruz I, Moreno J, Cordeiro-Da-Silva A. Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic

- and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis. *Parasites and Vectors*. 2013;6(1).
191. Da Luz RI, Vermeersch M, Dujardin JC, Cos P, Maes L. In vitro sensitivity testing of *Leishmania* clinical field isolates: Preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(12):5197-203.
192. Dupe A, Dumas C, Papadopoulou B. Differential Subcellular Localization of *Leishmania* Alba-Domain Proteins throughout the Parasite Development. *PLoS One*. 2015(1932-6203 (Electronic)).
193. Dupé A, Dumas C, Papadopoulou B. An Alba-domain protein contributes to the stage-regulated stability of amastin transcripts in *Leishmania*. *Molecular microbiology*. 2014;91(3):548-61.
194. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*. 1989 Aug 25;264(16):9251-9258 (Print).
195. McGwire BS, O'Connell WA, Chang KP, Engman DM. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis. Implications for parasite virulence. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(11):8802-9.
196. Lodish H BA, Zipursky SL, et al. Section 17.3, Overview of the Secretory Pathway. *Molecular Cell Biology*. 2000;4th edition. New York: W. H. Freeman.
197. Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion: A current view on cargo proteins and potential export routes. *European Journal of Biochemistry*. 2003;270(10):2109-19.
198. Silverman JM, Reiner NE. *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2011;1:26.
199. Valenzuela MMA, Ferguson Bennit HR, Gonda A, Diaz Osterman CJ, Hibma A, Khan S, et al. Exosomes Secreted from Human Cancer Cell Lines Contain Inhibitors of Apoptosis (IAP). *Cancer Microenvironment*. 2015;8(2):65-73.
200. Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Reports*. 2015;16(1):24-43.
201. Pant S, Hilton H, Burczynski ME. The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical Pharmacology*. 2012;83(11):1484-94.
202. Milane L, Singh A, Mattheolabakis G, Suresh M, Amiji MM. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *Journal of Controlled Release*. 2015;219:278-94.
203. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics*. 2008;8(19):4083-99.
204. Rochette A, McNicoll F, Girard J, Breton M, Leblanc E, Bergeron MG, et al. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2005;140(2):205-20.
205. de Paiva RMC, Grazielle-Silva V, Cardoso MS, Nakagaki BN, Mendonça-Neto RP, Canavaci AMC, et al. Amastin Knockdown in *Leishmania braziliensis* Affects Parasite-Macrophage Interaction and Results in Impaired Viability of Intracellular Amastigotes. *PLoS Pathogens*. 2015;11(12).
206. Welton JL, Khanna S, Giles PJ, Brennan P, Brewis IA, Staffurth J, et al. Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2010;9(6):1324-38.

207. Choi DS, Lee JM, Gun WP, Lim HW, Joo YB, Kim YK, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. *Journal of Proteome Research*. 2007;6(12):4646-55.
208. Hosseini-Beheshti E, Pham S, Adomat H, Li N, Tomlinson Guns ES. Exosomes as biomarker enriched microvesicles: Characterization of exosomal proteins derived from a panel of prostate cell lines with distinct AR phenotypes. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2012;11(10):863-85.
209. Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, et al. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *Journal of Proteome Research*. 2009;8(3):1304-14.
210. Skogberg G, Gudmundsdottir J, van der Post S, Sandstrom K, Bruhn S, Benson M, et al. Characterization of Human Thymic Exosomes. *PLoS One*. 2013;8(7).
211. Raj DAA, Fiume I, Capasso G, Pocsfalvi G. A multiplex quantitative proteomics strategy for protein biomarker studies in urinary exosomes. *Kidney International*. 2012;81(12):1263-72.
212. Kadiu I, Ricardo-Dukelow M, Ciborowski P, Gendelman HE. Cytoskeletal protein transformation in HIV-1-infected macrophage giant cells. *Journal of Immunology*. 2007;178(10):6404-15.
213. Chertova E, Chertov O, Coren LV, Roser JD, Trubey CM, Bess Jr JW, et al. Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *Journal of Virology*. 2006;80(18):9039-52.
214. Sandiford SL, Dong Y, Pike A, Blumberg BJ, Bahia AC, Dimopoulos G. Cytoplasmic Actin Is an Extracellular Insect Immune Factor which Is Secreted upon Immune Challenge and Mediates Phagocytosis and Direct Killing of Bacteria, and Is a Plasmodium Antagonist. *PLoS Pathogens*. 2015;11(2).
215. De Maio A, Vazquez D. Extracellular heat shock proteins: A new location, a new function. *Shock*. 2013;40(4):239-46.
216. Vega VL, Rodríguez-Silva M, Frey T, Gehrman M, Diaz JC, Steinem C, et al. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *Journal of Immunology*. 2008;180(6):4299-307.
217. Cohen-Saidon C, Carmi I, Keren A, Razin E. Antiapoptotic function of Bcl-2 in mast cells is dependent on its association with heat shock protein 90beta. *Blood*. 2006;107(4):1413-20.
218. Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummel-Smith J, Ouellette M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2007;6(1):88-101.
219. Nandan D, Yi T, Lopez M, Lai C, Reiner NE. *Leishmania* EF-1 α activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(51):50190-7.
220. Kern J, Untergasser G, Zenzmaier C, Sarg B, Gastl G, Gunsilius E, et al. GRP-78 secreted by tumor cells blocks the antiangiogenic activity of bortezomib. *Blood*. 2009;114(18):3960-7.
221. Langer R, Feith M, Siewert JR, Wester HJ, Hoefler H. Expression and clinical significance of Glucose Regulated Proteins GRP78 (BiP) and GRP94 (GP96) in human adenocarcinomas of the esophagus. *BMC Cancer*. 2008;8.

222. Zhao G, Kang J, Jiao K, Xu G, Yang L, Tang S, et al. High Expression of GRP78 Promotes Invasion and Metastases in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*. 2015;60(9):2690-9.
223. Biyani N, Madhubala R. Quantitative proteomic profiling of the promastigotes and the intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* isolates identifies novel proteins having a role in *Leishmania* differentiation and intracellular survival. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2012;1824(12):1342-50.
224. Vickers TJ, Fairlamb AH. Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(26):27246-56.
225. Beckler MD, Higginbotham JN, Franklin JL, Ham AJ, Halvey PJ, Imasuen IE, et al. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2013;12(2):343-55.
226. He M, Qin H, Poon TCW, Sze SC, Ding X, Co NN, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs. *Carcinogenesis*. 2015;36(9):1008-18.
227. Silva-Lopez RE, Morgado-Díaz JA, Alves CR, Corte-Real S, Giovanni-De-Simone S. Subcellular localization of an extracellular serine protease in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology Research*. 2004;93(4):328-31.
228. Alves CR, Corte-Real S, Bourguignon SC, Chaves CS, Saraiva EMB. *Leishmania amazonensis*: Early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. *Experimental Parasitology*. 2005;109(1):38-48.
229. Valdivieso E, Dagger F, Rascón A. *Leishmania mexicana*: Identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. *Experimental Parasitology*. 2007;116(1):77-82.
230. Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2002;120(1):1-21.
231. Gomez MA, Contreras I, Hallé M, Tremblay ML, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Science Signaling*. 2009;2(90).
232. Bastos IMD, Motta FN, Grellier P, Santana JM. Parasite prolyl oligopeptidases and the challenge of designing chemotherapeutics for chagas disease, leishmaniasis and african trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*. 2013;20(25):3103-15.
233. Conseil V, Soète M, Dubremetz JF. Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(6):1358-61.
234. Kong HH, Kim TH, Chung DI. Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba healyi* isolated from GAE. *Journal of Parasitology*. 2000;86(1):12-7.
235. Santana JM, Grellier P, Schrével J, Teixeira AR. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *The Biochemical journal*. 1997;325:Pt 1/.
236. Alexander J, Coombs GH, Mottram JC. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *Journal of Immunology*. 1998;161(12):6794-801.
237. Peltier J, Bellocq A, Perez J, Doublie S, Dubois YCX, Haymann JP, et al. Calpain activation and secretion promote glomerular injury in experimental glomerulonephritis: Evidence from calpastatin-transgenic mice. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(12):3415-23.

238. Menard HA, El-Amine M. The calpain-calpastatin system in rheumatoid arthritis. *Immunology Today*. 1996;17(12):545-7.
239. Kunimatsu M, Ma XJ, Nishimura J, Baba S, Hamada Y, Shioiri T, et al. Neutrophil chemotactic activity of N-terminal peptides from the calpain small subunit. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1990;169(3):1242-7.
240. Bates PA, Dwyer DM. Biosynthesis and secretion of acid phosphatase by *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1987;26(3):289-96.
241. Gottlieb M, Dwyer DM. Identification and partial characterization of an extracellular acid phosphatase activity of *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Cellular Biology*. 1982;2(1):76-81.
242. Fonseca-de-Souza AL, Dick CF, dos Santos ALA, Fonseca FV, Meyer-Fernandes JR. *Trypanosoma rangeli*: A possible role for ecto-phosphatase activity on cell proliferation. *Experimental Parasitology*. 2009;122(3):242-6.
243. Fonseca-de-Souza AL, Dick CF, Santos ALAD, Meyer-Fernandes JR. A Mg²⁺-dependent ecto-phosphatase activity on the external surface of *Trypanosoma rangeli* modulated by exogenous inorganic phosphate. *Acta Tropica*. 2008;107(2):153-8.
244. Shakarian AM, Dwyer DM. Structurally conserved soluble acid phosphatases are synthesized and released by *Leishmania major* promastigotes. *Experimental Parasitology*. 2000;95(2):79-84.
245. Remaley AT, Kuhns DB, Basford RE, Glew RH, Kaplan SS. Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O₂ - production. *Journal of Biological Chemistry*. 1984;259(18):11173-5.
246. Papadaki A, Politou AS, Smirlis D, Kotini MP, Kourou K, Papamarcaki T, et al. The *Leishmania donovani* histidine acid ecto-phosphatase LdMAcP: Insight into its structure and function. *Biochemical Journal*. 2015;467(3):473-86.
247. Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: A signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;18(2):293-305.
248. Kar S, Ukil A, Sharma G, Das PK. MAPK-directed phosphatases preferentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in experimental visceral leishmaniasis: Involvement of distinct protein kinase C isoforms. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010;88(1):9-20.
249. Figuera L, Acosta H, Gómez-Arreaza A, Dávila-Vera D, Balza-Quintero A, Quiñones W, et al. Plasminogen binding proteins in secreted membrane vesicles of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2013;187(1):14-20.
250. Figuera L, Gómez-Arreaza A, Avilán L. Parasitism in optima forma: Exploiting the host fibrinolytic system for invasion. *Acta Tropica*. 2013;128(1):116-23.
251. Vanegas G, Quiñones W, Carrasco-López C, Concepción JL, Albericio F, Avilán L. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitology Research*. 2007;101(6):1511-6.
252. Avilán L, Gualdrón-López M, Quiñones W, González-González L, Hannaert V, Michels PAM, et al. Enolase: A key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites - Perspectives for its use as a therapeutic target. *Enzyme Research*. 2011;2011(1).
253. Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, Da Silva JLM, Felipe MSS, De Santana JM, et al. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Research*. 2007;7(8):1381-8.

254. Kolli BK, Kostal J, Zaborina O, Chakrabarty AM, Chang KP. Leishmania-released nucleoside diphosphate kinase prevents ATP-mediated cytolysis of macrophages. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2008;158(2):163-75.
255. Postel EH. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2003;35(1):31-40.
256. Babady NE, Pang YP, Elpeleg O, Isaya G. Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(15):6158-63.
257. Forget G, Gregory DJ, Whitcombe LA, Olivier M. Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. *Infection and Immunity*. 2006;74(11):6272-9.
258. Forget G, Matte C, Siminovitch KA, Rivest S, Pouliot P, Olivier M. Regulation of the *Leishmania*-induced innate inflammatory response by the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *European Journal of Immunology*. 2005;35(6):1906-17.
259. Forget G, Siminovitch KA, Brochu S, Rivest S, Radzioch D, Olivier M. Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. *European Journal of Immunology*. 2001;31(11):3185-96.
260. Blanchette J, Racette N, Faure R, Siminovitch KA, Olivier M. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN- γ -triggered JAK2 activation. *European Journal of Immunology*. 1999;29(11):3737-44.
261. Nandan D, Tran T, Trinh E, Silverman JM, Lopez M. Identification of *leishmania* fructose-1,6-bisphosphate aldolase as a novel activator of host macrophage Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;364(3):601-7.
262. Yao C. Major surface protease of trypanosomatids: One size fits all? *Infection and Immunity*. 2010;78(1):22-31.
263. Furukawa T, Uchiumi T, Tokunaga R, Taketani S. Ribosomal protein P2, a novel iron-binding protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992;298(1):182-6.
264. Huynh C, Andrews NW. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. *Cellular Microbiology*. 2008;10(2):293-300.
265. Ganz T. Macrophages and systemic iron homeostasis. *Journal of Innate Immunity*. 2012;4(5-6):446-53.
266. Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, et al. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO Journal*. 1997;16(10):2590-8.
267. Krieger S, Schwarz W, Arlyanayagam MR, Fairlamb AH, Krauth-Siegel RL, Clayton C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular Microbiology*. 2000;35(3):542-52.
268. Berger LC, Wilson J, Wood P, Berger BJ. Methionine regeneration and aspartate aminotransferase in parasitic protozoa. *Journal of Bacteriology*. 2001;183(15):4421-34.
269. Marton LJ, Pegg AE. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1995;35:55-91.
270. Kim J, Chubatsu LS, Admon A, Stahl J, Fellous R, Linn S. Implication of mammalian ribosomal protein S3 in the processing of DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(23):13620-9.
271. Wilson Iii DM, Deutsch WA, Kelley MR. *Drosophila* ribosomal protein S3 contains an activity that cleaves DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(41):25359-64.

272. Kim Y, Kim HD, Youn B, Park YG, Kim J. Ribosomal protein S3 is secreted as a homodimer in cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013;441(4):805-8.
273. Jung EK, Kyung HK, Yeul HK, Sohn J, Yun GP. Identification of potential lung cancer biomarkers using an in vitro carcinogenesis model. *Experimental and Molecular Medicine*. 2008;40(6):709-20.
274. Mauel J. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Advances in Parasitology*; 1996. p. 1-51.
275. Puddu P, Fantuzzi L, Borghi P, Varano B, Rainaldi G, Guillemard E, et al. IL-12 Induces IFN-gamma Expression and Secretion in Mouse Peritoneal Macrophages. *Journal of Immunology*. 1997;159(7):3490-7.
276. Schindler H, Lutz MB, Rollinghoff M, Bogdan C. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *Journal of Immunology*. 2001;166(5):3075-82.
277. Di Marzio P, Puddu P, Conti L, Belardelli F, Gessani S. Interferon γ upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;179(5):1731-6.
278. Espir TT, Figueira LDP, Naiff MDF, Da Costa AG, Ramalho-Ortigão M, Malheiro A, et al. The Role of Inflammatory, Anti-Inflammatory, and Regulatory Cytokines in Patients Infected with Cutaneous Leishmaniasis in Amazonas State, Brazil. *Journal of Immunology Research*. 2014;2014.
279. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998;31(1):143-8.
280. Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clinical and Experimental Immunology*. 1993;91(3):500-5.
281. Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, Lessa M, et al. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Journal of Infectious Diseases*. 2006;194(4):519-27.
282. Oghumu S, Lezama-Dávila CM, Isaac-Márquez AP, Satoskar AR. Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Experimental Parasitology*. 2010;126(3):389-96.
283. Allavena P, Bianchi G, Zhou D, Van Damme J, Jílek P, Sozzani S, et al. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *European Journal of Immunology*. 1994;24(12):3233-6.
284. Ritter U, Moll H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *European Journal of Immunology*. 2000;30(11):3111-20.
285. Ritter U, Moll H, Laskay T, Brocker EB, Velazco O, Becker I, et al. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. 1996;173(3):699-709.
286. Dey R, Majumder N, Majumdar SB, Bhattacharjee S, Banerjee S, Roy S, et al. Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007;66(6):671-83.

10 APÊNDICES E/OU ANEXOS

10.1 Anexo 1. Sequencias de Primers usados na real time qPCR

Uniprot Cod	Target	Forward Primer	Reverse Primer	Product size (bp)	Slope	Efficiency / (E) (%)	Correlation coefficient (R ²)
A4H9P0	LBRM_18_1400	CCGCATCCCGATGATGAAGA	CTCGGACGCATTCAGAGTGA	76	3.31	100	0.99
A4H4C5	LBRM_05_0800	AAGGGTGCGTTCAAGATCCA	CTCGGCCTTGGTGCTAAACT	75	3.71	86	0.97
O44010	LIP2	CGGTGTTGCCATTGAGTTGT	TCATCGAAGCTCTTGCCCTC	69	3.29	101	0.94
A4HPA3	TAT	CGACCGATACCCAGACTTCG	CGTGGAGTTGCTGACCTTCA	56	3.82	83	0.98
A0A088RUF5	LPMP_281290	TGTGCCTCGTGTCCGGTAATG	GATGCACGGTGGTTCGACCT	80	3.22	104	0.96
A4HFB2	LBRM_26_2610	CGGTTCACAGGAATGGGTGA	ACCACCTTCAATGCGACTGT	104	3.39	97	0.95
A4H438	LBRM_04_1250	GGCGAACGAGGAGTCATTTG	ATCAGCGACGGCTTGAACAG	99	3.23	104	0.99
A4HDR9	LBRM_24_2150	AGACGCTGGTGAAGAACTGC	AAGTCGATGCCGTAATGCTT	82	3.25	103	0.98