

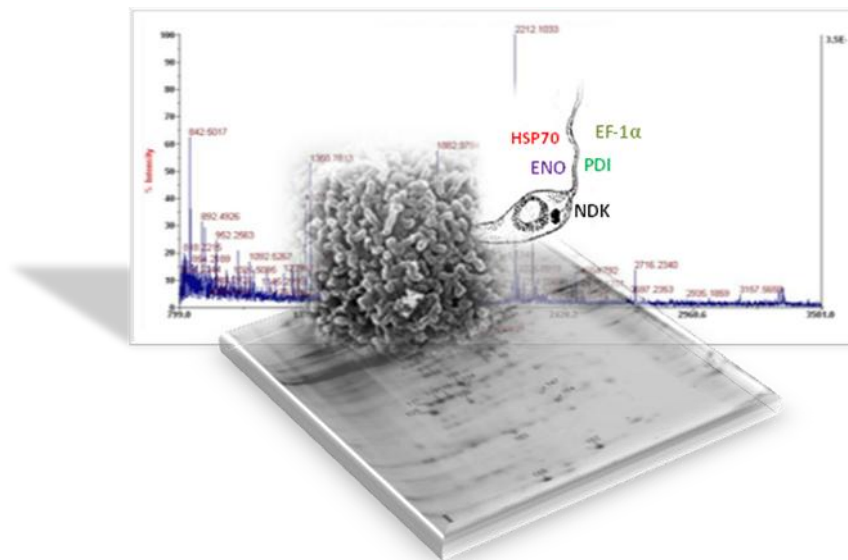


UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

**PROTEÍNAS ASSOCIADAS À INFECTIVIDADE EM
Leishmania (Leishmania) amazonensis Lainson e Shaw, 1972
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)**



LILIANE COELHO DA ROCHA

MANAUS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

PROTEÍNAS ASSOCIADAS À INFECTIVIDADE EM
***Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson e Shaw, 1972**
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)

LILIANE COELHO DA ROCHA

MANAUS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

LILIANE COELHO DA ROCHA

PROTEÍNAS ASSOCIADAS À INFECTIVIDADE EM
Leishmania (Leishmania) amazonensis Lainson e Shaw, 1972
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Antonia Maria Ramos Franco, INPA

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Flávia R A Campos Naief Moreira, UFAM

MANAUS

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAM

R672p Rocha, Liliane Coelho
Proteínas associadas à infectividade em *Leishmania (Leishmania)*
amazonensis Lainson e Shaw, 1972 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) /
Liliane Coelho da Rocha. - Manaus, AM: UFAM, 2011.
140 f.: il. color. ; 30 cm

Inclui referências.

Tese (Doutor em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas.
Orientador: Prof. Dra. Antonia Maria Ramos Franco.

1. *Leishmania* 2. Leishmaniose - Diagnóstico 3. Proteoma I. Franco,
Antonia Maria Ramos (Orient.) II. Título

CDU (2007): 616.993.161(043.2)

LILIANE COELHO DA ROCHA

**PROTEÍNAS ASSOCIADAS À INFECTIVIDADE EM
Leishmania (Leishmania) amazonensis Lainson e Shaw, 1972
(KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE)**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Saúde.

Aprovado em 30 de maio de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Antonia Maria Ramos Franco (INPA)

Prof. Dr. Jorge Luiz López-Lozano (FMT)

Prof^a. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira (FIOCRUZ)

Prof^a. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira (FIOCRUZ)

“A minha família e amigos pelo amor e incentivo para a realização deste trabalho”.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Na realização deste trabalho, diversas pessoas e instituições deram sua contribuição e merecem nossos sinceros agradecimentos:
- ✓ À DEUS, que em todos os momentos esteve presente de uma forma inigualável;
- ✓ À Dra. Antonia Maria Ramos Franco que, além de minha orientadora, ao longo destes muitos anos, tornou-se uma amiga na qual seu profissionalismo, competência, otimismo e perseverança foram pontos fundamentais para que eu pudesse espelhar-me na figura de uma cientista que merece todo meu respeito e admiração. Muito obrigada pela oportunidade de ter me ingressado na carreira científica, sempre compartilhando sua amizade, apóio e paciência que muito contribuiu para a formação do meu perfil científico;
- ✓ À Dra. Flávia R. A. Campos Naief Moreira pelo direcionamento e acompanhamento constante neste trabalho. Aos conselhos preciosos e com sabedoria que me fazem admirá-la pela competência e profissionalismo;
- ✓ Aos meus dois amores Daniel e Adam pela paciência, incentivo e apoio. Sem vocês esses passos não teriam sentido, pois vocês são a razão e o incentivo de seguir em frente;
- ✓ Ao meu pai que por muito pouco eu não teria sua companhia nestes momentos finais de tese. Agradeço a força, a fé e o otimismo que o senhor sempre me passou durante os momentos difíceis. Eu o amo muito!;
- ✓ Aos meus familiares pela força e orações;

- ✓ Aos amigos do INPA (Maricleide, Meire, Luís, Luanda, Sônia, Taís, Nívea, Alana, Fabiane e todos os alunos do PIBIC) pela paciência e auxílio em muitos momentos;
- ✓ Dentre esses amigos gostaria de uma forma muito especial dizer que você Luis foi o amigo da tese. Muito, Muito obrigada. E vamos pra Luz!!!!
- ✓ Aos amigos e funcionários do Laboratório (Ana Cleide, Nice, Artêmio, Robertinho, Lourival, Rui, Francisco, Cândido) pelo imenso carinho em todos os momentos;
- ✓ Às pesquisadoras Anita e Isabelle pela ajuda na digestão dos spots protéicos;
- ✓ Ao Dr. Palmas e a Dra. Lucilene UNESP/Rio Claro pela oportunidade de treinamento e ensinamentos proteômicos;
- ✓ À amiga Rogilene pelo apoio logístico em minhas jornadas por São Paulo em busca de conhecimento proteômicos;
- ✓ Aos amigos Anselmo, Yasmin e Rafael pelo enorme carinho dispensado a mim durante todos esses anos. Vocês são importantes em minha vida.
- ✓ À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade desta Pós-Graduação;
- ✓ Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pelo apoio logístico;
- ✓ À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Amazonas/FAPEAM pela concessão de bolsa e auxílio financeiro;
- ✓ À rede PROTEAM na pessoa do seu Coordenador Prof. Dr. Jorge Luiz Lopéz-Lozano por sempre estar disposto a ajudar;
- ✓ À Secretária de Ciência e Tecnologia do Amazonas (SECT/AM) pelo apoio financeiro;

- ✓ À todas as Instituições (UNESP-Rio Claro, FIOCRUZ e LNLS que contribuíram para a realização deste trabalho em relação a produção de mapas bidimensionais e identificação das proteínas por espectrometria de massas;

AGRADEÇO.

**“De todas as invenções, a mais preciosa
é o sonho”.**

Heinrich Heine (1797-185)

RESUMO

Variações nos quadros clínicos da leishmaniose sugerem a existência de uma diferenciação, dependente da espécie e na capacidade de parasitos do gênero *Leishmania* causar lesões no hospedeiro. A busca por fatores que diferenciam as espécies deste gênero quanto a sua infectividade e virulência se faz necessária para uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais esses parasitos causam danos aos seus hospedeiros, possibilitando assim a descoberta de novas ferramentas de potencial imunológico e terapêutico contra a leishmaniose. Embora muitos aspectos, da resposta imune a esse parasito, já sejam conhecidos, existem diversas lacunas no conhecimento relacionadas às características do próprio parasito que estejam envolvidas com a infecção. Ensaio *in vitro* e *in vivo* com promastigotas axênicas de fase logarítmica de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, mantidas por longos períodos em cultivo, incubados com macrófagos de linhagem e inoculados em mamíferos suscetíveis, mostraram-se incapazes de infectar macrófagos e hamsters. A perda da infectividade e virulência de formas promastigotas continuamente cultivadas provavelmente ocorreram devido à seleção na amostra inicialmente estável e infectiva para uma população de formas promastigotas não-infectivas. O genoma decifrado de *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) infantum* e os estudos funcionais de vários genes, por diferentes grupos de pesquisa, bem como de outras espécies do gênero, aliado ao avanço simultâneo da proteômica, acelerou e favoreceu de forma significativa o estudo da biologia do gênero *Leishmania*. O uso da técnica proteômica para o estudo de proteínas de *Leishmania* relacionadas à infectividade, através do uso de mapas 2-DE para a detecção dos perfis de expressão protéica das formas infectivas e não infectivas de *L. (L.) amazonensis* aliado a espectrometria de massas por ESI-QToF (Electrospray Ionization) para identificação das proteínas, foram utilizados nesse estudo. Foram detectados 251 e 145 “spots” protéicos diferentes nas formas promastigotas infectiva e não infectivas, respectivamente. A análise bidimensional (2-DE) de proteínas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* infectivas e não infectivas indicou diferenças na expressão protéica entre as formas estudadas, revelando a ausência de expressão de algumas proteínas nas amostras não infectivas. A maior parte das proteínas identificadas neste estudo está envolvida em processos metabólicos relacionados à infectividade e virulência de *Leishmania* como as: de choque térmico - HSP83 e HSP70, enzimas nucleosídeos difosfato quinase, dissulfeto isomerase, enolase, tripanotona redutase, triparedoxina peroxidase mitocondrial e ATPase, a triparedoxina citosólica e os fatores de alongamento α . Esses dados confirmam a exequibilidade de se fazer uma varredura do perfil protéico de um organismo relacionado à sua infectividade/virulência baseada nos perfis protéicos em 2-DE. Em vista dos resultados apresentados nos mapas 2-DE e na identificação das proteínas presentes nas formas estudadas podemos concluir que a infectividade e virulência de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* esta relacionada a um conjunto de fatores e proteínas cuja expressão é de fundamental importância para a sobrevivência/multiplicação do parasito no seu hospedeiro

Palavras-chave: infectividade – proteoma – *Leishmania amazonensis* – leishmaniose cutânea.

ABSTRACT

Variations in clinical manifestations of leishmaniasis suggest the existence of a differentiation species dependent in the ability of the *Leishmania* parasites cause lesions in the host. The search for factors that differentiate the species of this genus and its virulence and infectivity is needed to better understand the mechanisms by which these parasites cause damage to the reservoir hosts, thus enabling the discovery of new tools for immunological and therapeutic potential against leishmaniasis. Although many aspects of immune response to this parasite already known, there are several gaps in knowledge related to the characteristics of the parasite itself, that are related to infection. The *in vitro* and *in vivo* assays with axenic promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in logarithmic phase, maintained for long periods in culture, macrophages incubated with strain and inoculated in susceptible mammals, were unable to infect macrophages and hamsters. The loss of infectivity and virulence of promastigotes grown continuously, probably due to selection in the sample initially stable, and infective to a population of non-infective promastigotes. The decoded genome of *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Leishmania) infantum* and functional studies of many genes by different research groups, as well as other species of the genus, coupled with the simultaneous advance of proteomics, and accelerated favored significantly study the biology of the genus *Leishmania*. The use of proteomics technique for the study of proteins related to the infectivity of *Leishmania*, using 2-DE maps for the detection of protein expression profiles of infected and non infected forms of *L. (L.) amazonensis* coupled with mass spectrometry ESI-QToF (Electrospray Ionization) for identification of proteins were used in this study. Were detected 251 and 145 spots of proteins different in promastigotes infective and non-infective, respectively. The two dimensional (2-DE) proteins of *L. (L.) amazonensis* promastigotes infective and non infective indicated differences in protein expression among the forms studied, revealing the absence of expression of some proteins in the non infective samples. Most of the proteins identified in this study is involved in metabolic processes related to the infectivity and virulence of *Leishmania* such as: heat shock - HSP83 and HSP70, enzymes - nucleoside diphosphate kinase, protein disulfide isomerase, enolase, trypanothione reductase, mitochondrial trypanothione peroxidase and ATPase, cytosolic trypanothione and the elongation factor- α . These data confirm the feasibility of doing a sweep of the protein profile of an organism related to its infectivity/virulence protein profiles based on 2-DE. Given the results presented in 2-DE maps and the identification of proteins present in the forms studied we can conclude that the infectivity and virulence of promastigotes of *L. (L.) amazonensis* is related to a number of factors and proteins whose expression has fundamental importance for the survival/multiplication of the parasite in the reservoir-host.

Keywords: infectivity - proteome - *Leishmania amazonensis* - cutaneous leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO:

FIGURA 1- Modelo de origem e expansão da leishmaniose no Brasil. A esquerda, expansão segundo as duas correntes (COSTA, 1992) e a direita, expansão amazônica da Leishmaniose Tegumentar Americana (MARZOCHI, 2004). 06

FIGURA 2 - Ciclo de vida da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* mostrando a inoculação no hospedeiro de formas promastigotas, a interiorização em macrófagos e posterior diferenciação em amastigotas. As amastigotas intracelulares se multiplicam até romperem a célula hospedeira e circulantes no sangue são novamente fagocitadas pelos macrófagos ou ingeridas pelo inseto no momento do repasto sanguíneo. No interior do intestino médio do vetor biológico, as formas promastigotas se multiplicam e migram para o intestino anterior, a fim de infectarem o hospedeiro vertebrado novamente, durante o repasto sanguíneo, fechando assim o ciclo evolutivo. FONTE: (CASSILHAS, 2003). 13

FIGURA 3 - Ciclo de vida de *L. major* com a influência da picada do inseto vetor e o papel dos neutrófilos na patogênese da doença. FONTE: (PETERS; SACKS, 2009)..... 14

FIGURA 4 - Representação esquemática utilizada em estudos proteômicos. Confeção de géis bidimensionais associados à espectrometria de massas para a identificação de proteínas..... 26

CAPÍTULO I:

FIGURA 1 – Perfil eletroforético de proteínas expressas em amostras de promastigotas de *Leishmania amazonensis* de 3^a, 9^a, 11^a, 13^a, 14^a, 16^a, 18^a passagens *in vitro* e III-formas promastigotas de *Leishmania* não infectiva com mais de 90 passagens sucessivas *in vitro*. KDa = padrão de massa molecular. 38

CAPÍTULO II:

FIGURA 1 – Avaliação da infecção *in vitro* de macrófagos murinos de linhagem celular (linhagem J774) 24h após incubação com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infectiva (Llai) e não-infectiva (Lla ni). Imagem da esquerda mostra várias amastigotas no interior do macrófago enquanto que a imagem a direita ilustra a ausência de amastigotas (Lla ni) nas células fagocíticas..... 50

FIGURA 2 – Análise comparativa do perfil proteico (extrato total, 10⁹ parasitas) obtidos após separação por 2-DE (1a dimensão: IEF pH 4-7 gradiente linear e 2a dimensão: 15 % SDS-PAGE) de promastigotas infectivas (I) e não-infectivas (NI) de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Proteínas foram extraídas em tampão de lise (7M uréia/2M tiouréia) analisado por IEF a pH 7.4 e corado com comassie coloidal Brilliant Blue G-250. Spots protéicos foram identificados por espectrometria de massa por ESI-Qtof, numerados e suas identidades dadas na tabela 1. 51

FIGURA 3 – Perfil unidimensional de promastigotas infectivas (I) e não-infectivas (NI) de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* separadas por SDS-PAGE 15% e corados por Coomassie Blue coloidal. O gel revelou grande quantidade de bandas de alta massa molecular principalmente na forma infectiva 52

FIGURA 4 – Seções dos géis 2-DE mostrando spots ampliados diferencialmente expressos entre promastigotas infectivas (I) e não-infectivas(NI) de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Número dos spots: 7 – HSP70; 46 – tripanotona redutase; 182 - triparedoxina citosólica. a direita as imagens 3D dos spots mostrando a expressão diferencial em cada condição estudada. 35

FIGURA 5 – Seções dos géis 2-DE mostrando spots ampliados diferencialmente expressos entre promastigotas infectivas (I) e não-infectivas(NI) de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Número dos spots: 60, 63, 66, 67 – proteína dissulfeto isomerase 52 kDa (PDI); 85 – proteína de choque térmico de 83 kDa (HSP83) 55

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO:

TABELA 1 – Moléculas envolvidas na infectividade, patogenicidade e virulência em protozoários do gênero <i>Leishmania</i>	26
--	----

CAPÍTULO II:

TABELA 1 – Proteínas identificadas no banco de dados Mascot® em géis 2-DE de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> por espectrometria de massa (ESI-QTOF).	56
---	----

TABELA 2 – Categorias de processos biológicos das proteínas identificadas a partir de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> por espectrometria de massas.	62
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1- A leishmaniose	4
1.2- A <i>Leishmania</i>	6
1.3- Insetos vetores e hospedeiros	9
1.4 - Formas evolutivas e ciclo biológico	11
1.5- Epidemiologia.....	15
1.6- <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> Lainson e Shaw, 1972	18
1.7- Interação Parasito-hospedeiro: infectividade e virulência.....	19
1.8- Aplicação da proteômica ao estudo de proteínas de <i>Leishmania</i>	22
2. OBJETIVOS	32
2.1- Objetivo Geral	32
2.2 – Objetivos Específicos.....	32
3. CAPÍTULO I: Influência na infectividade de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> após sucessivas passagens em cultivo	33
4. CAPÍTULO II: Expressão diferencial de proteínas em formas promastigotas infectantes e não infectantes de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	40
5. DISCUSSÃO GERAL	80
6. CONCLUSÕES.....	94
7. PERSPECTIVAS.....	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
9. ANEXOS	114

1. INTRODUÇÃO

A infecção por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* está associada a um amplo espectro de características clínicas que vão desde lesões cutâneas auto-cicatrizantes na leishmaniose tegumentar americana (LTA) até as formas fatais que podem vir a ocorrer na leishmaniose visceral. O quadro clínico depende principalmente da espécie infectante, porém fatores relacionados com o hospedeiro também podem determinar o curso da infecção (MAUEL, 2002). Dentre as espécies de *Leishmania* envolvidas na formação de lesões na LTA e que ocorrem no Amazonas destaca-se a *L. amazonensis* com ampla distribuição ocorrendo na bacia amazônica, em áreas de florestas primárias e secundárias tipo várzea e igapó (Amazonas, Pará, Rondônia e sudoeste do Maranhão) e em outros Estados do Brasil. Esta espécie ocasiona no homem a forma cutânea, cutâneo-mucosa, e uma forma anérgica conhecida como leishmaniose cutânea difusa (LAINSON; SHAW, 2005).

O sucesso alcançado na infecção pelo parasito está relacionado às mudanças na forma e na expressão de substâncias ocorridos durante a transformação que ele passa dentro dos hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (fêmeas de flebotomíneo) (SACKS; PERKINS, 1984; BATES, 1994).

As leishmânias ocorrem em duas formas evolutivas principais e distintas: as promastigotas, encontradas no trato digestório do inseto vetor (fêmeas de flebotomíneos) e as amastigotas encontradas em células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. Durante sua migração pelo intestino do inseto vetor, as promastigotas passam por uma série de transformações morfológicas e bioquímicas como as nectomonas, haptomonas e paramastigotas que culminam em sua transformação da forma procíclica (não-infectiva) para

a forma metacíclica (infectiva) para o hospedeiro vertebrado (WALTERS et al., 1993; VIVENES et al., 2005). Esse processo, conhecido como metaciclogênese, pode ser mimetizado *in vitro*. Observou-se que durante o cultivo *in vitro*, as promastigotas em fase estacionária apresentam-se diferenciadas em sua forma metacíclica (SACKS; PERKINS, 1984; BATES, 1994). Outra observação relevante é que promastigotas mantidas *in vitro* por sucessivas passagens perdem a capacidade de infectar o hospedeiro vertebrado. Esta perda de infectividade está associada à alteração da expressão de uma série de proteínas e carboidratos de superfície (DE; ROY, 1999; BEETHAM et al., 2003) como a GP63 que apresenta sua expressão reduzida após uma série de passagens em cultivo em *L. amazonensis* (McGWIRE; CHANG, 1994) e *L. chagasi* (mais de 12 semanas) [ROBERTS et al., 1995].

Durante o ciclo biológico ocorrem interações entre o parasito e o sistema imune do hospedeiro mamífero que podem levar ao estabelecimento da infecção e determinar o curso da doença. Dentre estas interações pode se destacar o papel de uma glicoproteína conhecida como GP46 que protege o parasito da ativação do sistema complemento em *L. chagasi* e a GP63 que participa na adesão, penetração e sobrevivência do parasito no macrófago (célula do sistema fagocítico mononuclear no qual o parasito se multiplica) em *L. infatum* e *L. amazonensis* (GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, 1997; THIAKAKI, 2006; BEETHAM, 2003).

Em relação ao tratamento ainda existe a necessidade de se definir um protocolo adequado. Até o momento, no Brasil, a terapia com antimoniais ainda é a mais eficiente, no entanto, esse tipo de tratamento acarreta diversos efeitos colaterais (HERWALDT, 1999). Assim sendo, existe uma urgência na melhor compreensão dos mecanismos da infecção e do funcionamento do sistema imune do hospedeiro às diferentes espécies de *Leishmania*, assim como, em conjunto com os estudos de novos métodos e drogas contra a infecção, favorecendo uma terapêutica eficaz da população atingida.

O processo de desenvolvimento de novas drogas e vacinas é lento e envolve uma série de etapas, sendo a primeira delas a identificação de proteínas que possam servir como alvo desses agentes. Até recentemente, a identificação tem sido realizada de forma empírica, através da identificação de proteínas por métodos convencionais de purificação. No entanto, modernas tecnologias como a genômica e proteômica, representam um importante avanço nessa etapa do processo. O uso de ferramentas proteômicas tem sido de grande utilidade para a identificação em larga escala do conjunto de proteínas resultantes da expressão gênica trazendo um avanço no processo de descoberta de novos métodos de prevenção e tratamento (MANN et al., 2001; NYMAN, 2001).

A proteômica, ou seja, o estudo do proteoma é um dos campos que pode ajudar a estabelecer uma conexão entre as seqüências gênicas e o comportamento biológico de seus produtos e também tem se mostrado uma interessante abordagem no desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos (CUNNINGHAM, 2000).

Nas leishmanioses, a identificação de proteínas relacionadas à infectividade através de géis bidimensionais associados à espectrometria de massas poderá ser favorável para o desenvolvimento de drogas e vacinas mais efetivas para essa doença.

Em relação às espécies que causam a LTA, o estudo torna-se de particular interesse para a saúde pública do estado do Amazonas, local onde é notificada alta incidência desse tipo de infecção. O conhecimento gerado a respeito das proteínas de *Leishmania* em diversas fases do seu ciclo de vida é de extrema importância para a elucidação de aspectos biológicos do parasito e no estabelecimento da doença possibilitando um vasto campo para as pesquisas aplicadas, apontando alvos biotecnológicos para o desenvolvimento de produtos que ajudem na prevenção, diagnóstico e tratamento desta doença.

1.1- A Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, do gênero *Leishmania*, acometendo hospedeiros mamíferos, tais como o homem que vem a ser um hospedeiro acidental. Os sintomas desta doença diferem de acordo com a espécie do parasito envolvida e da relação parasito x hospedeiro, podendo produzir desde lesões cutâneas auto-resolutivas até lesões mucosas desfigurantes ou a forma visceral (MS, 2007).

No Velho Mundo a descoberta do parasito causador da forma cutânea é bastante controversa. Embora os créditos sejam dados ao americano James Homes Wright (1903), não existem dúvidas quanto aos mesmos terem sido observados pela primeira vez por David Cunningham em 1885.

Em 1925, na revista *Annaes Brasileiros de Dermatologia e Syphilographia*, Eduardo Rabello publica na seção de "Memórias Originais" o trabalho intitulado "Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil", que tratava do histórico e da sinonímia da doença. Naquela revisão, conclui o autor que a leishmaniose tegumentar já existia no país desde muitos anos e distingue três períodos na história da doença. O primeiro, de origem incerta e baseada em referências vagas, vai até 1895, ano da observação clínica do 'botão da Bahia' e sua filiação ao 'botão do Oriente'. O segundo estende-se até 1909, quando é identificado e descrito o agente etiológico da "úlceras de Bauru". O terceiro se inicia em 1910 com o achado do parasito em lesões mucosas, então incorporadas ao quadro clínico da doença, indo até a época da publicação do artigo (VALE; FURTADO, 2005). A única indicação segura e talvez mais antiga da existência da doença no Brasil verifica-se em citação na tese de Tello, "Antiguedadde la syphilis en el Perú", de 1908, relativa à obra escrita,

Pastoral Religioso-Político Geographico, editada em 1827, que descreve a viagem de um missionário pela região amazônica. Este observara a existência de indivíduos com úlceras nos braços e pernas, relacionadas a picadas de insetos, tendo como consequência lesões destrutivas de boca e nariz. Sem ter sido mencionada anteriormente no Brasil, Rabello achava mais razoável supor que, endêmica na Amazônia, porém proveniente do Peru e da Bolívia, a doença pudesse ter-se disseminado nos estados do Norte do país por indivíduos que para lá se dirigiram em busca de trabalho nos seringais e que retornaram infectados as suas origens. Quanto às regiões Centro e Sul do Brasil, achava mais verossímil a importação da Bolívia ou da Amazônia, via Mato Grosso, e provavelmente também do Paraguai, via Mato Grosso ou Paraná, considerando sua existência de forma endêmica naqueles países, muito antes do descobrimento (VALE; FURTADO, 2005).

Existem duas correntes (Figura 1) que tentam explicar a penetração da leishmaniose no Brasil, uma defendida por Rabello (1925), de que tenha entrado pelo Peru e Bolívia e outra liderada por Moreira (1906) e Pupo (1926a), de que a doença tenha sido importada pelos sírios que aportaram no Brasil em Salvador e Recife (COSTA, 1992).

Admite-se que a leishmaniose tegumentar americana (LTA) seja uma doença autóctone do continente americano (PESSOA et al., 1948). Marzochi et al. (1994), baseados em estudos epidemiológicos e da distribuição geográfica de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em diferentes ecossistemas, envolvendo vetores e reservatórios diversos, sugerem a hipótese de que a origem e difusão da doença humana, pela migração inter-regional, tenha se iniciado a partir da região ocidental amazônica (Figura 1), principalmente ao sul do rio Marañón-Solimões-Amazonas (NEGRÃO; FERREIRA, 2009).

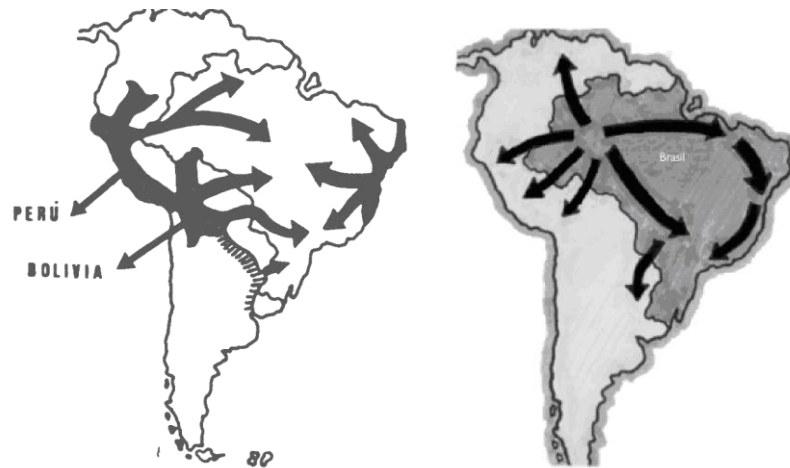


Figura 1- Modelo de origem e expansão da leishmaniose no Brasil. A esquerda, expansão segundo as duas correntes (COSTA, 1992) e a direita, expansão amazônica da Leishmaniose Tegumentar Americana (MARZOCHI, 2004).

1.2- A *Leishmania*

As descrições na literatura mostram que a LTA é uma doença que acomete o homem desde a antiguidade com relatos na literatura desde o século I d.C. Achados de cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., no Peru apresentam mutilações de nariz e lábios, que são características da chamada espúndia, ou como hoje é denominada leishmaniose cutâneo-mucosa. Outras descobertas contribuíram para reafirmar a presença da LTA como as múmias com lesões de pele e mucosa característica desta doença (TELLO, 1908).

O agente etiológico da leishmaniose foi observado pela primeira vez por Cunningham em 1885 na Índia, em casos de leishmaniose visceral (PESSOA, 1958; ALBUQUERQUE et al., 1996). A primeira referência da LTA no Brasil foi feita no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827 produzido por Frei Dom Hypólito Sanches em sua viagem de Tabatinga (AM) até o Peru (TELLO, 1908).

Em 1855, Cerqueira observou lesões na pele de LTA denominando clinicamente como botão de Biskra. Posteriormente, Breda (1895) na Itália identificou a doença em italianos provenientes de São Paulo.

A descoberta deste protozoário foi publicada em 1903 por Wright, apesar de anteriormente (1898) outro pesquisador o russo Peter Fokitsch Borovsky já haver associado o parasito a doença, porém seus achados só foram conhecidos após a segunda guerra mundial (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

O agente etiológico da chamada úlcera oriental do Velho Mundo foi descoberta em 1903 por Leishman e Donovan e denominada *Leishmania tropica* em 1906. As lesões de pele observadas em indivíduos humanos da região Neotropical só foram associadas aos parasitos do gênero *Leishmania* em 1909 em estudos independentes de Lindenberg, Carini e Paranhos que demonstraram a presença da forma arredondada do parasito em lesões de indivíduos com a úlcera de Bauru em São Paulo. Finalmente, em 1911, Splendore demonstrou a presença do parasito em lesões mucocutâneas de pacientes e no mesmo ano foi descrita a espécie *L. braziliensis* por Gaspar Vianna em estudos com pacientes em Minas Gerais.

A associação das lesões cutâneas e nasofaríngeas com a leishmaniose foi confirmada, pela primeira vez no Brasil, por Lindenberg em 1909, que encontrou em lesões cutâneas, em pacientes envolvidos na construção da Estrada de Ferro Noroeste em São Paulo, apresentando formas do protozoário idênticas à *L. tropica* do Velho Mundo.

Em 1911, Gaspar de Oliveira Vianna relacionou as lesões de pele e mucosa, como sendo provocadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*, no qual ele denominou de *L. braziliensis*.

Até a década de setenta, no Brasil, todos os casos de LTA eram relacionados com a *L. braziliensis*, porém após o avanço e aprimoramento das técnicas de caracterização e tipagem,

estudos ecológicos e epidemiológicos, mais espécies foram descritas, perfazendo um total, até o momento, de sete espécies causadoras desta doença no homem. Sendo assim, baseado em critérios clínicos, epidemiológicos e biológicos, Lainson e Shaw (1987) agruparam as espécies que parasitam o homem em dois subgêneros: a) *Leishmania* - espécies pertencentes aos complexos *donovani*, *mexicana* e *tropica*: *Leishmania amazonensis* Lainson; Shaw, 1972; e b) *Viannia* - espécies pertencentes ao complexo *braziliensis*: *Leishmania guyanensis* Floch, 1954; *L. lainsoni* Silveira, 1987; *L. naiffi* Lainson; Shaw, 1989; *L. shawi* Lainson et al., 1989; *L. lindenbergi* Silveira et al., 2002 e *L. braziliensis* Vianna, 1911. Dentre estas, destacam-se as espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* (LAINSON; SHAW, 1972; GRIMALDI; TESH, 1993) com ocorrência também no Amazonas (GRIMALDI; MCMAHON-PRATT, 1991; GRIMALDI; DENOMINADI et al., 1991; SILVEIRA et al., 2002).

Segundo adaptação de Cox (2005), Lainson e Shaw (2005) as espécies neotropicais do gênero *Leishmania*, encontram-se classificadas como sendo:

Reino: Protozoa Goldfuss, 1818

Filo: Euglenozoa Cavalier-Smith, 1991

Classe: Kinetoplastida: Honigberg, 1963

Ordem: Trypanosomatida Kent, 1880

Família: Trypanosomatidae Doflein, 1901

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903

Subgênero: *Leishmania* Ross, 1903

Subgênero: *Viannia* Lainson e Shaw, 1987

1.3- Insetos vetores e hospedeiros

O papel do flebotomíneo como vetor de LTA no Brasil foi determinado a partir de 1921 apesar de se suspeitar de sua participação na transmissão desde 1911 (SERGENT et al., 1921; ARAGÃO, 1922).

Segundo palavras do Frei Don Hypolito Sanchez, torna-se clara a evidência da ocorrência de leishmaniose e sua associação aos vetores (RABELLO, 1925; PESSOA; BARRETO, 1948), pois:

“[...] de los mosquitos y otras muchas espécies de moscardones y de sus picaduras o mordeduras de estos, salem las llagas asquerosas y muchas de una conseqüência fatal... es comum en todas estas tierras a la par de su fertilidad e humedades, la lepra e el quedar-se siu narices, sino se vive com precaución...; porque ... los mosquitos y demás insetos, son si no se tiene euydado, un poderoso fomento de las llagas profundas y fetidas en piernas y brazos, herdor de boca, galico [...]”.

Ainda sobre o seu relato, Azulay (1952) destaca o fato de, apesar de a doença ser ainda desconhecida, essa foi a primeira vez que se fez referência quanto à transmissão da leishmaniose por picadas de “mosquitos”.

Os vetores das Leishmanioses são conhecidos como flebótomos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), pertencentes a várias espécies e diferentes gêneros, dependendo da localização geográfica (YOUNG; DUNCAN, 1994; LEMOS et al., 2001).

São insetos hematófagos, pertencentes aos gêneros *Chinius*, *Sergetomyia*, *Phlebotomus* (do Velho Mundo), *Brumptomyia*, *Lutzomyia* e *Warileya* (do Novo Mundo). Apenas dois gêneros são realmente importantes para a epidemiologia das leishmanioses:

Phlebotomus transmissores de leishmaniose na África, Europa e Ásia e *Lutzomyia* nas Américas (ARIAS; FREITAS, 1977; YOUNG; DUNCAN, 1994).

O gênero *Lutzomyia* França 1924 é o de maior número de espécies e de ampla distribuição geográfica, com representantes desde os Estados Unidos até o Norte da Argentina. Em todo o mundo são conhecidas, aproximadamente, 800 espécies de flebotomíneos, sendo 60% na região Neotropical. Das mais de 500 espécies conhecidas de flebotomíneos nas Américas, pouco mais de 400 pertencem ao gênero *Lutzomyia*, o qual é formado por 15 subgêneros, 11 grupos de espécies e duas espécies com descrição deficiente (YOUNG; DUNCAN, 1994; REBELO et al., 1999; GIL et al., 2003).

No Brasil, tem-se conhecimento, até o momento, de 229 espécies, representando 28,6% do total e 47,7% das que ocorrem na região Neotropical (REBELO, 1999; GIL et al., 2003; AGUIAR; MEDEIROS, 2003; ANDRADE et al., 2007).

Da maioria de espécies de flebotomíneos registradas no Brasil, cerca de aproximadamente 52% já foram registradas na Amazônia (ARIAS; FREITAS, 1977; YOUNG; DUNCAN, 1994; RANGEL; LAINSON, 2003).

Apesar do número considerável de espécies de flebotomíneos no Continente americano, apenas uma pequena percentagem dessas são suspeitas e/ou comprovadas vetoras de leishmaniose. Existem muitas evidências que algumas espécies de leishmânias podem ser transmitidas somente por certas espécies de flebotomos, pela íntima associação entre lipofosfoglicanos (LPGs) do parasito e receptores de membrana dos vetores (PIMENTA et al., 1994; DIAS-LIMA et al., 2002).

A leishmaniose é primariamente uma zoonose onde animais tais como, raposas, roedores, edentados, marsupiais entre outros participam como reservatórios desta protozoose.

A participação de roedores na epidemiologia da leishmaniose foi feita em 1957, por Hertige, no Panamá, onde se detectou *L. braziliensis* em "ratos de espinho" (*Proechimys semispinosus* e *Hoplomys gymminurus*) sem nenhuma lesão aparente. Neste estudo foi isolado parasito em meio de cultura a partir do sangue destes animais. Forattini et al. (1960, 1972, 1973) conseguiram demonstrar infecção de roedores por isolamento do parasito em cultura de sangue e pele. Em 1962 e 1964 em estudos sobre a epidemiologia da LTA, Lainson e Strangways-Dixon demonstraram diversas lesões ricas em amastigotas idênticas as lesões em humanos em roedores silvestres.

A partir destas descobertas levanta-se a hipótese de que espécies de *Leishmania* em seu hábitat florestal primitivo teriam se adaptado ou estariam se adaptando a animais ali existentes, inclusive ao homem e animais domésticos, e que o tipo da lesão pode funcionar como índice desta adaptação do parasito ao hospedeiro, de modo que, quanto maior fosse a adaptação, menor a gravidade da lesão, podendo atingir um estado de equilíbrio em que estas não se manifestariam mais, de tal maneira que estes hospedeiros podem passar a desempenhar a função de reservatório do parasito (FORATTINI, 1960). Lainson e Shaw (1992) reforçam que, entre animais silvestres, a infecção tende a ser benigna e inaparente, sugestiva de uma relação equilibrada resultante de uma antiga associação entre hospedeiro - parasito.

1.4- Formas evolutivas e ciclo biológico

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos digenéticos (heteroxenos) que apresentam em seu ciclo de vida duas formas evolutivas principais: forma amastigota, nos organismos vertebrados, e promastigota, nos invertebrados. A forma promastigota multiplica-

se por divisão binária longitudinal dentro do tubo digestivo do inseto vetor (flebótomo). Possui estrutura alongada, com um único núcleo, com flagelo livre e cinetoplasto anterior ao núcleo medindo entre 14 e 20 μm . As formas promastigotas são introduzidas no hospedeiro vertebrado pela picada do inseto vetor e invadem o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. No momento em que as fêmeas de flebotomíneos fazem o repasto sanguíneo, tem início a fase de desenvolvimento intracelular do parasita que se transforma em forma amastigota. As amastigotas têm forma arredondada com flagelo interno, núcleo único, com cinetoplasto, mede entre 2,1 e 3,2 μm e se multiplicam no interior dos macrófagos. Quando um flebótomo não infectado ingere células parasitadas no repasto sanguíneo, as células se rompem no interior de seu intestino e liberam as formas amastigotas, que se transformam em promastigotas (HOARE; WALLACE, 1966).

Esses protozoários fazem parte de uma ordem que apresenta, como característica, um DNA mitocondrial conhecido como kDNA ou cinetoplasto (SIMPSON, 1987).

Esse ciclo básico (Figura 2), dentro do hospedeiro mamífero, tem sido mostrado por anos, porém, recentemente foi descrito um ciclo (Figura 3) onde ocorre a participação dos neutrófilos como células participantes na transferência de *Leishmania* para o macrófago (PETERS et al., 2008). Neste ciclo, o inseto vetor ao picar o hospedeiro mamífero deposita parasitos na derme e epiderme. O dano tecidual causado pela picada leva a um intenso recrutamento de neutrófilos e a formação de “plugs” de neutrófilos na região da pele perfurada pelo inseto. Os neutrófilos fagocitam a maioria dos parasitos (80-90%) e um número menor de promastigotas têm acesso direto a macrófagos/monócitos (10–20%) e ainda poucos entram direto em células dendríticas (1–5%). De um a dois dias após a infecção, os parasitos começam sua transição para fora dos neutrófilos sendo ingeridos pelos fagócitos. Outra forma de aquisição destes parasitos é pela ingestão direta de neutrófilos parasitados via cavalo de Tróia. Populações de macrófagos/monócitos e células dendríticas infectadas são

também expostas a corpos apoptóticos e a grandes números de neutrófilos não-apoptóticos infectados que vão modular negativamente os mecanismos inatos de morte do parasito e as funções de células apresentadoras de antígenos (PETERS et al., 2008; RITTER et al., 2009).

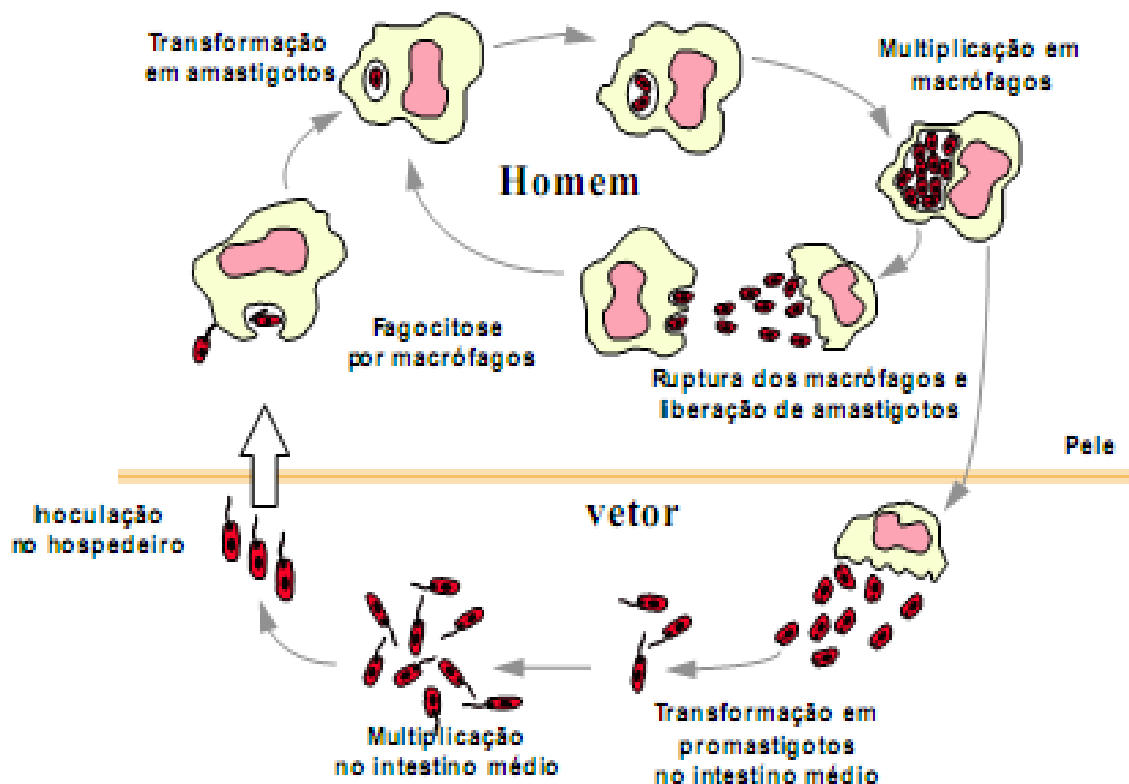


Figura 2 - Ciclo de vida da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* mostrando a inoculação no hospedeiro de formas promastigotas, a interiorização em macrófagos e posterior diferenciação em amastigotas. As amastigotas intracelulares se multiplicam até romperem a célula hospedeira e circulantes no sangue são novamente fagocitados pelos macrófagos ou ingeridas pelo inseto no momento do repasto sanguíneo. No interior do intestino médio do vetor biológico, as formas promastigotas se multiplicam e migram para o intestino anterior, a fim de infectarem o hospedeiro vertebrado novamente, durante o repasto sanguíneo, fechando assim o ciclo evolutivo.

FONTE: CASSILHAS (2003).

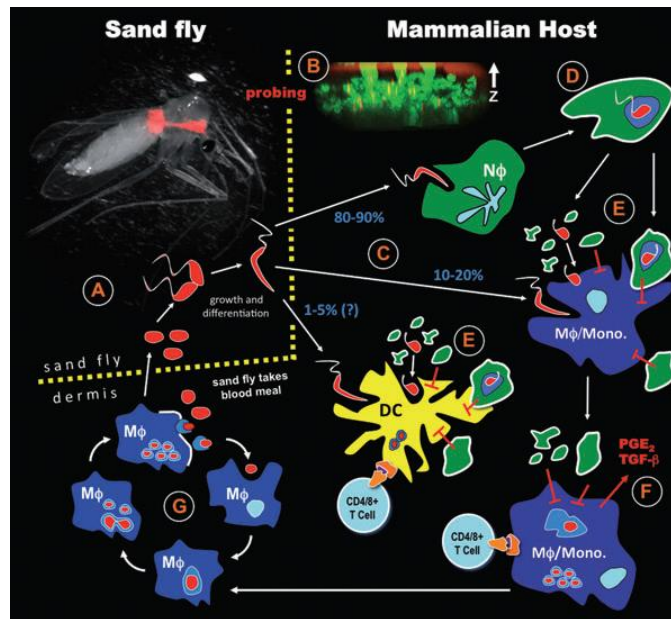


Figura 3 - Ciclo de vida de *L. major* com a influência da picada do inseto vetor e o papel dos neutrófilos na patogênese da doença

FONTE: PETERS; SACKS (2009).

A - *Phlebotomine* spp. realizam o repasto sangüíneo em um indivíduo infectado, adquirindo os parasitos por este processo. Amastigotas intracelulares sofrem transformação, crescem e se diferenciam no intestino do inseto vetor, eventualmente se transformam em promastigotas metacíclicas se posicionando no intestino anterior. A figura é de um *Phlebotomus dubosqi* infectado com *L. major* expressando RFP (“Red fluorescent protein”);

B - Em busca de um segundo repasto sangüíneo, o inseto pica a pele de hospedeiro mamífero, criando uma poça hemorrágica do qual ele se alimenta e simultaneamente deposita parasitos na derme e epiderme. O dano tecidual causado pela picada do inseto induz o recrutamento de neutrófilos neste local e a formação de “plugs” (tampão) de neutrófilos na pele perfurada pela probóscide do vetor. A figura mostra promastigotas metacíclicas de *L. major* - RFP depositada entre neutrófilos marcados com Lys-GFP^{hi} (“Green fluorescent protein”) [para se visualizar *in vivo* no local da picada, usou-se uma cepa de *L. major* marcada com proteína fluorescente de cor vermelha e células de camundongos expressando proteína fluorescente de cor verde controladas pelo promotor de lysozima endógena /PETERS et al. 2008] e “plugs” de neutrófilos espalhados pela epiderme e extrato córneo;

C - Neutrófilos predominam no sítio do dano tecidual após a picada do inseto e fagocitam a maioria dos parasitos (80-90%). Um número menor de parasitos tem acesso direto a macrófagos/monócitos (10–20%). Poucos parasitos entram direto nas células dendríticas residentes da derme (1–5%);

D - Na pele, neutrófilos infectados não conseguem matar a *L. major* e as células parasitadas adquirem marcadores apoptóticos, como fosfatidilserina (indicado pela marcação branca na superfície celular);

E - Posteriormente (1-2 dias), parasitos começam a transição para fora dos neutrófilos e para os macrófagos/monócitos e células dendríticas. A aquisição de parasitos por esses fagócitos pode acontecer via ingestão de parasitos viáveis liberados de neutrófilos infectados ou pela ingestão direta dos neutrófilos parasitados, isto é, pela via cavalo de Tróia. Macrófagos/monócitos e populações de células dendríticas infectadas também são expostas aos corpos apoptóticos e a grande número de células não infectadas, neutrófilos apoptóticos que irão modular ambos os mecanismos inatos de morte do parasito e a função das APC (células apresentadoras de antígeno);

F - Durante a fase silenciosa do crescimento de parasitos, neutrófilos são persistentemente recrutados e mantidos no local da picada por fatores derivados do inseto, a morte dos parasitos e a função das APC continuam sendo suprimidas. Essa supressão está associada com a produção de citocinas não inflamatórias PGE₂ e TGF-β;

G - Parasitos se propagam na área inflamatória, nas células da pele derivadas de monócitos e aumentam suficientemente o seu número de forma que eventualmente são endocitados por células dendríticas imunocompetentes na pele ou são drenadas para os linfonodos, iniciando a ativação de células T e a fase de cura da doença.

1.5- Epidemiologia

Conhecida por diferentes denominações, esta doença pode ser designada como leishmaniose tegumentar, leishmaniose ulcerosa, leishmaniose americana entre outras. Pessoa e Barreto (1948) listam, ainda, uma série de nomes dados de acordo com suas formas clínicas: leishmaniose cancerosa, pé vegetante, verrucoso, papilomatoso ou musgoso, leishmaniose cavitária. Outros nomes regionais também podem ser encontrados para designar a doença, como úlcera ou botão de Bauru, botão do Oriente, ferida brava, nariz de tapir. Em outras línguas, como o espanhol, podemos achar as denominações de “uta”, “espúndia”, “úlceras de los chicleros”. Em inglês, recebe o nome de “forest yaws”, “mossy foot”, “ear ulcer of chicleros”. Em francês, “pian-bois”. Em holandês “boshyaws” ou “boessie-yassi”, e “buba” ou “buba brasileira” em italiano.

A LTA, comumente descrita como uma zoonose de animais silvestres foi associada à floresta da região neotropical mesmo antes de ser conhecido o seu modo de transmissão pelos flebótomos (BRUMPT; PEDROSO, 1913).

Alguns anos mais tarde, essa associação foi estabelecida e alguns chegaram a acreditar que com a derrubada das florestas primitivas, a doença tenderia a diminuir ou a se extinguir ou ainda poderia se tornar limitada a pequenos focos florestais (PESSOA; BARRETO, 1948; SAMPAIO, 1951). Porém, o que ocorreu foi um aumento no número de novos casos em regiões desmatadas há muito tempo e em áreas peri-urbanas. Esses achados demonstraram uma adaptação tanto dos insetos vetores como dos reservatórios, revelando mudanças na biologia desses vetores como nas suas preferências alimentares e nos horários de atividade. Um novo quadro se estabeleceu quanto à transmissão que não mais estava somente associado

à derrubada recente da mata, mas a indivíduos que se infectam em locais de desmatamento antigos (SAF'JANOVA, 1971; LAINSON; SHAW, 1987; FELINTO DE BRITO, 1993).

Devido às mudanças ambientais causa\das pelo homem em áreas de florestas neotropicais no Brasil, é estabelecido um novo foco de leishmaniose tegumentar. O que contraria a expectativa inicial de que a destruição dessas áreas levaria à diminuição desse problema de saúde. São destacados três fatores importantes e responsáveis pelo incremento de casos da doença em determinadas áreas: (i) a destruição das florestas, (ii) as profundas alterações do meio ambiente e (iii) a situação sócio-econômica com significativo aumento no número de pessoas carentes (RANGEL, 1995).

Atualmente o quadro epidemiológico estabelecido mostra que o meio ambiente é fator determinante na transmissão da LTA. Fatores como micro-clima, relevo, espécies de animais reservatórios e fauna de flebotomíneos, limitam os circuitos de ocorrência da doença. Desta forma, a presença do homem nestes ambientes proporciona a ocorrência da doença sob a forma de zoonose. A invasão da floresta pelo homem propicia a adaptação de vetores e reservatórios silvestres ao ambiente peridomiciliar ou até mesmo domiciliares, causando uma maior dificuldade na adoção de medidas de controle desta endemia (ANDRADE, 1998; COSTA, 2005).

Na região amazônica a LTA é transmitida principalmente nas florestas ou em áreas recentemente desmatadas. Em Manaus, pode-se caracterizar a transmissão peri-urbana da endemia da seguinte forma: o homem expande a malha urbana até a floresta, promovendo o desmatamento para construção de novos conjuntos habitacionais. Por um período de tempo significativo as espécies de flebotomíneos transmissores, que possuem hábitos estritamente silvestres, permanecem no local transmitindo o parasito. Não encontrando mais um ambiente adequado, em função do desaparecimento da suas principais fontes de alimentação, que são os

animais silvestres, geralmente caçados ou que se deslocaram para o interior da mata, os flebotomíneos modificam seu comportamento buscando fontes de repasto sanguíneo nas habitações próximas à floresta primária (ANDRADE, 1998).

Mundialmente, as leishmanioses estão classificadas entre as seis doenças prioritárias no programa de controle de doenças da Organização Mundial de Saúde. A importância mundial das Leishmanioses é verificada pelo cálculo do índice global de 400.000 casos por ano, havendo indicações de aumento a cada ano. Dentre as leishmanioses a LTA é amplamente distribuída pelo continente americano, porém a sua prevalência real não está bem definida devido a fatores como sub-registro de dados (WHO, 2004).

Cerca de 60% dos casos de leishmaniose que ocorrem no Brasil estão na região da Amazônia brasileira. Entre os estados dessa região, o Amazonas é o segundo mais atingido por casos da LTA, estando atrás somente do Pará (DEVEP/SVS/MS, 2009).

Em 2008 foram registrados 2.060 casos de LTA, que comparado ao registro de 1.502 casos em 2009, apresenta redução de 27,08% nos casos confirmados no Amazonas. A faixa etária de maior incidência é na população acima de 15 anos de idade, o que corresponde à fase de busca ao trabalho e/ou busca de produtos extrativistas, porém, foi observado o comprometimento expressivo numa faixa etária menor de 1 a 14 anos de idade, o que concorre para transmissão intra-domiciliar e peridomiciliar da LTA. O sexo masculino apresentou 79% dos casos registrados de LTA, com igualdade de raças e com menor incidência em pessoas com escolaridade completa. As gestantes corresponderam apenas a 1,40% dos casos da doença no Amazonas (FVS, 2010).

Manaus é o município do Amazonas com o maior número de casos registrados seguido de Rio Preto da Eva e Itacoatiara. Em 2009 foram notificados 648 casos em Manaus com uma

diminuição em 2010 para 390 casos, porém nos primeiro semestre de 2011 já foram registrados 474 casos (SINANNET 2011).

1.6- *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson e Shaw, 1972

No Continente Americano, as leishmanioses cutâneas são mais frequentemente causadas pela *L. mexicana*, *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*. Esta última pode, embora raramente, causar também a forma clínica difusa da doença e leishmaniose visceral, além da forma cutânea, cutâneo-mucosa (LAINSON; SHAW, 1987).

A infecção por *L. amazonensis* está relacionada à leishmaniose cutâneo difusa, com uma lesão papular primária e várias lesões satélites desenvolvendo ao redor desta. Formas amastigotas do parasito se disseminam produzindo nódulos cutâneos múltiplos na face e extremidade do corpo (LAINSON; SHAW, 1987).

Essa forma difusa apresenta-se sem ulceração com uma resposta anérgica dos pacientes ao antígeno do parasito, reação de hipersensibilidade tardia negativa e sem resposta tanto de proliferação como de produção de citocinas, ao antígeno de *Leishmania* (CONVIT et al., 1989).

A *L. amazonensis* foi descrita em 1972 por Lainson e Shaw que em 1968 a isolaram de tecido da orelha de *P. guyanensis* sem nenhuma lesão aparente, sendo na época denominada *L. mexicana amazonensis*.

Apresenta-se distribuída no Brasil, principalmente na bacia amazônica, em áreas de florestas primárias e secundárias tipo várzea e igapó (Amazonas, Pará, Rondônia e sudoeste do Maranhão), e também na Bahia, em Santa Catarina (GRISARD et al., 2000), em Minas

Gerais e em Goiás. Está presente em outros países como Colômbia, Paraguai, Bolívia e Guiana Francesa. Foram descritas 13 espécies de mamíferos silvestres albergando o parasito, sendo a mais importante o "rato de espinho" (*Proechimys* sp.), que raramente desenvolve a doença (LAINSON, 1988). Tem como principal vetor a espécie *Lutzomyia flaviscutellata*, um flebotomíneo de hábito noturno e pouco antropofílico, e *L. olmeca nociva* como vetor secundário no Amazonas e em Rondônia (MARZOCHI, 1992; LAINSON, 1997; SILVEIRA et al., 1997).

O genoma de *Leishmania* é composto de aproximadamente 36 pares de cromossomos que variam entre 0,3-2,5 Mb, formando um genoma de aproximadamente 34 Mb. Estima-se que o genoma de *Leishmania* contenha 8.272 genes que codificam proteínas e apenas 36% deste total pode ser atribuída uma função (IVENS et al., 2005). *L. amazonensis* e outras espécies do mesmo subgênero contem apenas 34 pares de cromossomos, devido à fusão do cromossomo oito com 29 e 20 com 36 (STILES et al., 1999). O significado desses rearranjos biológicos ainda é desconhecido, mas é possível que esses eventos influenciem na expressão de proteínas e conseqüentemente, na relação parasito-hospedeiro.

1.7- Interação Parasito-hospedeiro: infectividade e virulência

A infectividade é o nome que se dá ao conjunto de qualidades específicas do agente, que lhe permite vencer barreiras externas e penetrar em outro organismo vivo, aí se multiplicando com maior ou menor facilidade. A patogenicidade é a capacidade de o agente infeccioso, uma vez instalado no organismo do homem ou de outros animais, produzir sintomas em maior ou menor proporção dentre os hospedeiros infectados e a virulência é a

capacidade de um microrganismo produzir casos graves ou fatais. Esta última relaciona-se com a produção de toxinas e à sua capacidade de multiplicação no organismo parasitado (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999; POULIN; COMBES, 1999).

Para o estabelecimento de uma infecção, são necessários diversos mecanismos fisiológicos que envolvem a expressão de uma variada quantidade e tipos de substâncias tanto do microrganismo invasor, quanto do hospedeiro. E não somente da expressão, como também das interações químicas que irão ocorrer entre elas, formando uma rede metabólica complexa que na maioria dos organismos ainda não é conhecida (Tabela 1). Dependendo de como se dará a interação parasito-hospedeiro o grau de patogenicidade pode levar a danos irreversíveis no hospedeiro (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999).

Os estudos sobre substâncias indicativas da infectividade em protozoários de *Leishmania* têm sido durante anos de grande interesse de pesquisadores em todo mundo, de forma isolada ou em conjunto essas substâncias vem sendo extensivamente estudadas para fins de conhecimento básico ou aplicado, como na biotecnologia (TURCO; DESCOTEAUX, 1992; MCWIRE; CHANG, 1994; BEETHAM et. al., 2003; TONKS, 2003; THIAKAKI, 2006).

A biologia de diversas espécies de parasitos demonstra que os eventos ocorridos nas fases iniciais da infecção por *Leishmania*, bem como os fatores de virulência, são cruciais para o estabelecimento da infecção (Tabela 1).

A interação entre o sistema imune inato e adquirido do hospedeiro mamífero e o parasito define o curso da infecção que pode evoluir para a cura espontânea ou a progressão da doença desencadeando diversas formas clínicas (GRIMALDI JR; TESH, 1993; RIVAS et al., 2004).

A LTA se apresenta clinicamente sob quatro formas distintas: cutânea localizada, mucosa, disseminada e cutânea difusa. Devido ao parasitismo ser do tipo intracelular obrigatório, o principal mecanismo de defesa é a produção adequada de IFN- γ . Assim, linfócitos produtores desta citocina permitem a ativação de macrófagos infectados e a adequada eliminação da *Leishmania*.

Abordagens experimentais demonstraram que a resposta à infecção com *L. major* é variável dependendo de fatores genéticos dos animais infectados. Camundongos C57/Bl-6 apresentam uma resposta do tipo Th1, caracterizada pela produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α , associados à cura espontânea da lesão e resistência ao patógeno. Por outro lado, camundongos BALB/c apresentaram uma resposta do tipo Th2, com produção de IL-4 e IL-5, estando associadas à susceptibilidade à infecção e proliferação do parasito (REINER; LOCKSLEY, 1995; MULLER et al., 1989; THEODOS et al., 1991).

A resposta imune no homem, que inicialmente é protetora, pode vir a contribuir para a patogênese da doença, num momento mais tardio, causando principalmente lesão tecidual. Na leishmaniose cutânea localizada e na forma mucosa, há uma resposta do tipo I intensa, controlando a multiplicação do parasito e contribuindo para a lesão tecidual. Por outro lado, na forma disseminada e difusa a resposta do tipo I pode apresentar-se diminuída ou ausente e resulta na proliferação e disseminação do parasito (BARRAL et al., 1995).

No ciclo do invertebrado, após a transformação dos amastigotas em promastigotas no intestino anterior, essas formas migram pelo trato digestório do inseto vetor passando por uma série de modificações morfológicas e bioquímicas que culminam em sua transformação da forma procíclica (não-infectiva) para a forma metacíclica (infectiva) para o hospedeiro vertebrado (WALTERS et al., 1993; VIVENES et al., 2005). Esse processo conhecido como metaciclogênese pode ser mimetizado *in vitro*. Nestas condições, foi observado que as

promastigotas em fase estacionária apresentam-se diferenciadas em sua forma metacíclica (SACKS; PERKINS, 1984; BATES, 1994)

Neste ambiente *in vitro* promastigotas mantidas por sucessivas passagens perdem a capacidade de infectar o hospedeiro vertebrado. Esta perda de infectividade está associada à alteração da expressão de uma série de proteínas e carboidratos de superfície como a GP46 em *L. chagasi* que apresentou redução em seu nível de 50% após oito passagens *in vitro* e galactosiltransferase em *L. donovani* que tem sua expressão e regulação somente em parasitos atenuados, induzindo galactosilação em carboidratos de superfície do parasito estimulando o burster do macrófago e inibindo o parasitismo intracelular *in vitro*. Tem sido demonstrado em *L. chagasi* e *L. amazonensis* que o papel da glicoproteína GP46 é proteger o parasito da lise do sistema complemento (DE T; ROY, 1999; BEETHAM et al., 2003).

A baixa da virulência em parasitos de longo tempo de passagens *in vitro* (mais de 100) também está associada à atividade de ectonucleotidases em *L. amazonensis* na infecção de camundongos C57B/6 (SOUZA et al., 2010). A participação desta enzima está relacionada com a hidrólise de ATP extracelular para produção de adenosina (DE SA PINHEIRO et al., 2008; LEITE et al., 2007). Está enzima tem extrema importância pelo fato que neste organismo não está presente a via de síntese de nucleotídeos purina dependendo da ação desta enzima para produção desta molécula (COHN; GOTTLIEB, 1997).

Outra glicoproteína importante na infectividade de *Leishmania* é a GP63 que participa da adesão, penetração e sobrevivência do parasito no macrófago em *L. infantum* e *L. amazonensis* (GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, 1997; THIAKAKI, 2006; BEETHAM, 2003). Participa na degradação de proteínas séricas, incluindo o complemento, gerando epítomos adicionais como C3bi que ajuda na fixação do parasito à membrana da célula fagocitária via receptor CR3 (BRITTINGHAM et. al., 1995). Além disso, a protease também

protege o parasito da degradação intrafagolisossomal presumivelmente pela inativação de enzimas hidrolíticas (CHAUDHURI et al., 1989; MCWIRE; CHANG, 1994).

Outro composto (não protéico) importante, presente na superfície do parasito, e que participa da interação com o hospedeiro é o lipofosfoglicano (LPG). Este glicolípídeo é um dos mais abundantes na superfície de promastigotas de *Leishmania*, forma um denso glicocálix ao redor do parasito (TURCO; DESCOTEAUX, 1992). Tem participação importante na interação *Leishmania*-complemento e ainda, se liga e interage com outras proteínas do soro para promover a entrada na célula hospedeira. O LPG pode contribuir para a habilidade de *Leishmania* resistir ou escapar aos efeitos leishmanicidas dos macrófagos (DESCOTEAUX; TURCO, 2002). Nesses fagócitos, os LPGs apresentam vários efeitos como, por exemplo, inibição da maturação do fagossomo, inibição da proteína C quinase e modulação da produção de óxido nítrico (NO) [DESCOTEAUX; TURCO, 2002; WINBERG et al., 2009].

A atividade da proteína quinase pode está associada à metaciclogênese em *L. amazonensis*, visto que, apresentou-se duas vezes maior na forma promastigota metacíclica quando comparada a forma não infectiva desta espécie (GENESTRA et al., 2004),

Em pesquisas recentes foi identificada, em estudos com mutantes de *L. amazonensis*, a participação de uma proteína denominada META2, localizada no citoplasma e na ponta do flagelo de promastigotas (RAMOS, 2006), que confere proteção ao parasito frente ao choque térmico e stress oxidativo das células de defesa do hospedeiro (RAMOS et al., 2011).

1.8- Aplicação da proteômica ao estudo de proteínas de *Leishmania*

Com a aplicação da espectrometria de massas no estudo de biomoléculas a partir do final da década de 80 do século XX, foi possível o desenvolvimento de duas novas técnicas que permitiam a ionização destas macromoléculas em um estado gasoso, etapa imprescindível para uma medida precisa da massa molecular. As duas técnicas, desorção ionizante assistida por uma matriz (MALDI) e ionização por eletrodispersão (ESI), tornaram-se amplamente utilizadas na identificação e sequenciamento dos polipeptídeos (KARAS; HILLENKAMP, 1988; FENN et al., 1989).

Com o desenvolvimento desta tecnologia foi possível aplicá-la à área da saúde, possibilitando a caracterização de proteínas diferencialmente expressas em organismos com alguma patologia, e a consequente identificação de proteínas alvo para ação de drogas (APPELLA et al., 2000).

A partir de então, a combinação da técnica de eletroforese em duas dimensões, capaz de separar centenas ou milhares de proteínas em um único experimento, com as técnicas de espectrometria de massas, capaz de identificar o conteúdo protéico de cada região do gel, tornou-se a melhor estratégia disponível para a identificação em larga escala do conjunto de proteínas resultantes da expressão gênica (MANN et al., 2001; NYMAN, 2001).

Como o desenvolvimento da proteômica baseado na espectrometria de massas (Figura 4) a identificação com alta qualidade de um grande número de proteínas tornou-se possível, como também, a caracterização em grande escala de modificações pós-traducionais (MACCOSS et al., 2002; BEAUSOLEIL et al., 2004).

Tabela 1. Moléculas envolvidas na infectividade, patogenicidade e virulência em protozoários do gênero *Leishmania*.

MOLÉCULA	ESPÉCIE	ATIVIDADE	AUTOR
Sintase do Acido Graxo Cilopropano (CFAs)	<i>L. brasiliensis</i> e <i>L. infantum</i>	Enzima que participa na síntese do CFA; os ácidos graxos podem ser fontes de carbono e energia para parasito sobreviver dentro do fagolisossomo	PEACOCK et al., 2007
GP63	<i>L. amazonensis</i>	Proteção contra lisossomos	THIAKAKI, 2006
Proteína tirosina fosfatase (PTP)	<i>Leishmania</i> sp.	Sobrevivência de amastigotas em hamsters; Controle da fosforilação de tirosina; Diferenciação do parasito;	NASCIMENTO, 2006
Cisteína Protease	<i>L. chagasi</i> e <i>L. mexicana</i>	Expresso somente em amastigota, sobrevivência no macrófago; fator de virulência	VASANTHAKRISHNA, 2005; MOTTRAM et al., 1996
Proteína quinase (PKA)	<i>L. amazonensis</i>	Envolvimento na metaciclologênese – 2X maior na forma metacíclica - sugerindo uma associação desta atividade com o processo de metaciclologênese.	GENESTRA et al., 2004
PTP	<i>L. donovani</i>	Mediação da diferenciação do estágio promastigota; Indução da expressão de proteínas específicas de amastigotas; Aumento da virulência em hamsters;	NASCIMENTO et al., 2003
GP46 (PSA)	<i>L. chagasi</i>	Transformação de proclíclico para metacíclico; Proteção do complemento;	BEETHAM, 2003;
Polipeptídeos 60-65kDa 47-50kDa 115, 52, 45kDa 32 e 25kDa	<i>L. amazonensis</i>	Expressos em promastigotas virulentos e não virulentos; Maior quantidade em virulentos;	SOARES et al., 2003
Galactosiltransferase	<i>L. donovani</i>	Associado a diminuição da virulência do parasito	BHAUMIK et al., 2003; DE T; ROY, 1999
Proteofosfoglicano	<i>L. mexicana</i>	Enfraquece o sistema complemento	HOCKS et al., 2000
Superróxido dismutase	<i>Leishmania</i> sp.	Neutraliza os reativos do O ₂	ROITT et al., 1999
GP63	<i>L. infantum</i>	Participa na entrada e sobrevivência do parasito no macrófago;	GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, 1997
Leishporina	<i>L. amazonensis</i> e <i>T. cruzi</i>	Forma poros na membrana do macrófago	HORTA, 1997
Acido Fosfatase	<i>Leishmania</i> sp.	Sobrevivência do parasito na célula do hospedeiro. Desfosforilam fosfoproteínas da superfície de células fagocitárias suprimindo a produção de metabólitos de oxigênio nestas células	REMALEY et al., 1985; SAHA et al., 1985

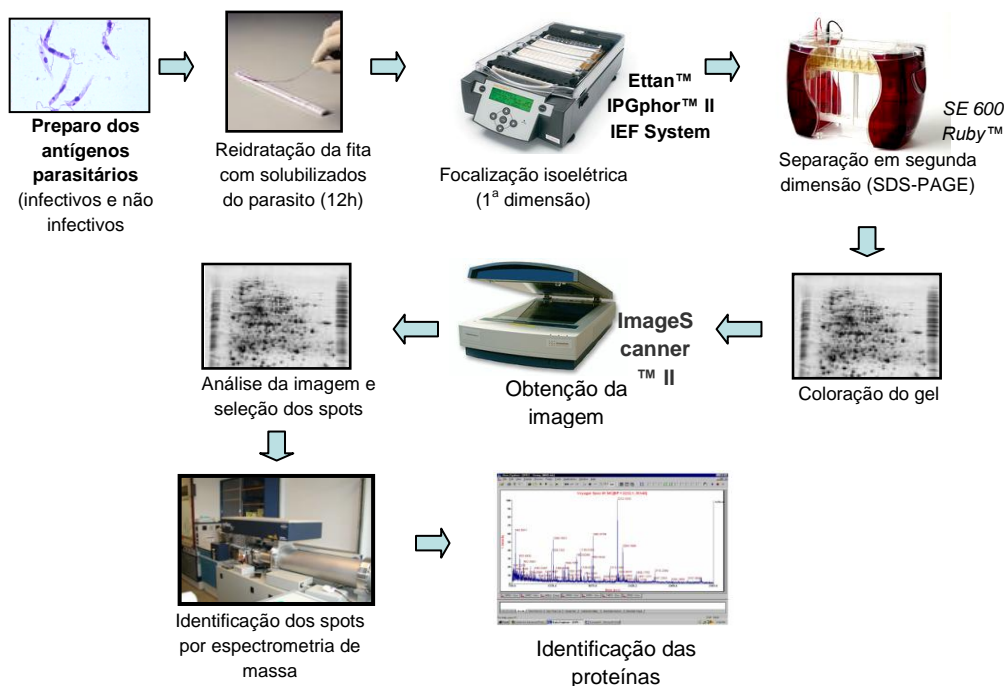


Figura 4 - Representação esquemática utilizada em estudos proteômicos. Confecção de géis bidimensionais associados à espectrometria de massas para a identificação de proteínas.

Após o estabelecimento da técnica bidimensional e a identificação das proteínas por espectrometria de massas, em conjunto com a descrição do genoma de vários eucariotos, muitos organismos começaram a ser estudados em todo mundo, do ponto de vista proteômico, desde os mais simples, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, passando por organismos que formam agregados multicelulares, como a ameba *Dictyostelium discoideum*, até organismos mais complexos, como o verme *Caenorhabditis elegans* e a mosca *Drosophila melanogaster* (SANCHEZ et al., 1996; PAYNE; GARRELS, 1997; YAN et al., 1997; GEIER et al., 1999; ERICSSON, et al., 1997). Da mesma forma estudos proteômicos foram iniciados com humanos num esforço integrado de estabelecer a análise do proteoma em condições “saudáveis” e em processos patológicos (O’DONOVAN et al., 2001).

No campo da saúde humana e animal, estudos proteômicos de parasitos têm uma aplicação potencial na descoberta de drogas e vacinas (BROPHY et al., 2000).

Diversos parasitos que fazem parte do grupo dos protozoários são causadores de doenças humanas, constituindo assim um grupo de grande interesse para a realização de estudos proteômicos, os quais permitem o isolamento e a identificação de proteínas alvos para a terapêutica.

A literatura descreve diversos estudos, neste campo, de protozoários com *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* e *Dictyostelium discoideum* (YAN et al., 1997; CHANDA et al., 2005; ATWOOD III et al., 2005) e *Leishmania*. As espécies *L. infantum* e *L. donovani*, causadores da forma visceral desta doença, e *L. major* responsável pela forma tegumentar no velho mundo tem sido as mais estudadas (THIEL; BRUCHHAUS, 2001; EL FARKHRY et al., 2002; BENTE et al., 2003; DRUMMELSMITH et al., 2003; 2004; KAMOUN-ESSGHAIER et al., 2005).

Dentre os primeiras pesquisas proteômicas com *Leishmania* está o de Saraiva et al. (1984), que utilizou a técnica de gel bi-dimensional para diferenciar espécies de *Leishmania* causadoras da LTA. Neste estudo foram realizadas comparações entre o complexo *L. mexicana* e complexo *L. braziliensis* que revelaram diferenças marcantes entre os grupos e similaridades entre subespécies dentro de cada complexo (subgênero) o que pôde ser visto pela eletroforese bidimensional. Atualmente, estes complexos foram elevados a subgêneros, respectivamente *Leishmania* e *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987).

Thiel e Bruchhaus (2001) realizaram análise proteômica comparativa de *L. donovani* em diferentes estágios de transformação de promastigota para amastigota e verificaram diferenças

entre os estágios de diferenciação. Entre o terceiro e o quinto dia de transformação foram expressos 20 novos “spots” e inibidos outros 50 “spots” dos 400 expressos no estágio inicial.

Em 2002, Acestor et. al., compararam vários métodos de preparação de amostras de *Leishmania* sp. demonstrando que o uso do método de solubilização contendo Nonidet P-40 (NP-40) como detergente apresentava uma alta resolução e reprodutibilidade nos géis 2-DE/SDS-PAGE.

El Fakhry et. al. (2002), identificaram proteínas reguladoras do desenvolvimento em *L. infantum* através da aplicação da ferramenta proteômica e espectrometria de massa. Mais de 62 proteínas foram expressas especificamente em amastigotas entre os 2000 “spots” revelados no gel 2D. Nos resultados do estudo foram identificadas duas proteínas que fazem parte do metabolismo energético, a isocitrato desidrogenase e a enzima glicolítica triosefosfatase isomerase.

No estudo realizado por Soares et al., (2003) que investigou a expressão diferencial de proteinases e polipeptídeos da superfície de promastigotas virulentos e avirulentos de *L. amazonensis* usando géis uni e bidimensionais, mostrou que dois polipeptídeos de maior peso molecular 65-60 e 50-47 kDa foram expressos em ambas as formas promastigotas e que pequenas diferenças quantitativas foram observadas em polipeptídeos de 115, 52, 45,32, e 25 kDa que foram preferencialmente expressos em formas virulentas. Viram ainda que a atividade de cisteína proteinase foi maior em formas virulentas do parasito. De acordo com os autores, esses resultados sugerem que polipeptídios da superfície celular e cisteína proteases intracelulares têm um importante papel na virulência desta espécie.

De acordo com Cunningham (2000), a tecnologia proteômica tem se mostrado uma interessante abordagem no desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas e essa tecnologia

pode ser utilizada na identificação mais rápida de novas proteínas, na avaliação de seu padrão de expressão e de suas funções, possibilitando a identificação de potenciais alvos para drogas.

Dentro desta abordagem, pesquisas mostraram a aplicação desta metodologia na investigação de moléculas alvo para drogas e de mecanismos de resistência a drogas por *Leishmania* (DRUMMELSMITH et al., 2003).

Nugent et al. (2004), realizaram a primeira análise proteômica das formas em diferenciação de *L. mexicana* e o primeiro registro proteômico do estágio metacíclico - fase infectiva de uma espécie. As proteínas que foram identificadas fazem parte de oito grupos funcionalmente relacionados, alguns dos quais estão implicados na infectividade e interação parasito-hospedeiro. Estes autores verificaram a existência de 47 “spots” estágios-específicos em *L. mexicana* com variação na intensidade em 100 “spots”, durante a diferenciação de promastigotas metacíclicas para amastigotas do flagelado.

Um passo importante nos conhecimentos sobre proteínas de *Leishmania* do Novo Mundo foi dado nos estudos de Cuervo et al. (2007) que revelaram o proteoma de *L. braziliensis* onde mais de 600 spots foram revelados e destes, 75 proteínas foram identificadas por MALDI-TOF-TOF e agrupadas em 15 categorias funcionais. Este estudo representou, na época, a primeira publicação do mapa bidimensional de *L. braziliensis* nas condições de pI 4-7 MW 10-130kDa e indicou uma relação entre EF-1 β e o desenvolvimento biológico deste parasito, indicando-o como possível fator de virulência.

Nos estudos comparativos de promastigotas metacíclicas e procíclicas de *L. major* foram verificados diferenças de expressão de proteínas envolvidas na síntese protéica e na mobilidade dos parasitos. Os promastigotas metacíclicos expressaram menor quantidade de spots envolvidos

na síntese de proteínas, enquanto as proteínas envolvidas na mobilidade, incluindo a proteína para flagelar 1D, α e β tubulina foram as mais abundantes. Além disso, duas enzimas mitocondriais (succinil-CoA sintetase subunidade beta e citocromo c oxidase subunidade IV) foram diferencialmente expressas em ambas as fases do ciclo de vida. A regulação de proteínas relacionadas à via de biossíntese em promastigotas metacíclicos foi consistente com o a alta taxa de divisão vista nesta fase do parasito, enquanto a regulação das proteínas relacionadas à mobilidade em promastigotas metacíclicos está de acordo com a alta motilidade observada neste estágio do ciclo de vida (MOJTAHEDI et al., 2008).

Em vista de todo esse histórico, a dinâmica nos estudos proteômicos de *Leishmania* evoluíram de uma visão básica para investigações mais aplicadas em que vários trabalhos têm tratado com estudos proteômicos de expressão gênica estágio-específico (EL FAKHRY et al., 2002; BENTE et al., 2003; NUGENT et al., 2004; FOUCHER et al., 2006; McNICOLL et al., 2006; WALKER et al., 2006; LEIFSO et al., 2007; PAAPE et al., 2008; ROSENZWEIG et al., 2008a; ROSENZWEIG et al., 2008b), para identificação de candidatos a vacinas (FORGBER et al., 2006; DEA-AYUELA et al., 2006; GUPTA et al., 2007), para estudos de patogênese (WALKER et al., 2006; SILVERMAN et al., 2008; CUERVO et al., 2009) ou para estudos de resistência a drogas (DRUMMELSMITH et al., 2003; DRUMMELSMITH et al., 2004; VERGNES et al., 2007).

As mudanças ocorridas nos últimos anos no campo do estudo de moléculas, principalmente proteínas, abre um vasto campo para estudos aplicados que levem ao melhor conhecimento da biologia de protozoários patogênicos como as espécies do gênero *Leishmania*.

A *Leishmania amazonensis* é um parasito com um ciclo de vida complexo, caracterizado por mudanças morfológicas e metabólicas sensíveis a estímulos originados no ambiente em que o parasito se encontra. Isto o faz um modelo interessante para o estudo da diferenciação celular, infectividade e virulência em eucariotos com o uso de tecnologias proteômicas.

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral:

- ✓ Verificar através de tecnologia proteômica as proteínas associadas à infectividade em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*;

2.2- Objetivos Específicos:

- ✓ Avaliar a infectividade de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* mantidas em cultivo por longo tempo em modelos *in vivo* e *in vitro*, em comparação com populações recém-isoladas.

Capítulo I: Influência na infectividade de promastigotas de *Leishmania amazonensis* após sucessivas passagens em cultivo.

(Revista de patologia Tropical, submetido em 17 de maio de 2011)

- ✓ Indicar quais as principais proteínas envolvidas na infectividade das formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, utilizando-se uma abordagem proteômica.

Capítulo II: Expressão diferencial de proteínas em formas promastigotas infectantes e não infectantes de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

(Journal of proteomics, submetido em 12 de maio de 2011)

3. CAPÍTULO I

**INFLUÊNCIA NA INFECTIVIDADE DE PROMASTIGOTAS DE
LEISHMANIA AMAZONENSIS APÓS SUCESSIVAS PASSAGENS EM CULTIVO**

NOTA

*Revista de Patologia Tropical***INFLUÊNCIA NA INFECTIVIDADE DE PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* APÓS SUCESSIVAS PASSAGENS EM CULTIVO**

Liliane Coelho da Rocha,¹ Alana Cristina Vinhote-Silva,¹ Flávia Regina Almeida-Campos² e Antonia Maria Ramos Franco¹

RESUMO

Este estudo foi realizado com a finalidade de avaliar a infectividade de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* mantidas em cultivo por longo tempo em modelos *in vivo* e *in vitro*, em comparação com populações recém-isoladas. Após cultivo por 24 meses, formas promastigotas perderam a capacidade de infectar e produzir lesões cutâneas em animais experimentais, assim como para fagócitos da linhagem J774, ao contrário do observado com formas promastigotas recém-isoladas. A perda da virulência de formas promastigotas continuamente cultivadas provavelmente ocorreram devido à seleção na amostra inicialmente estável e virulenta para uma população de formas promastigotas totalmente avirulentas.

DESCRITORES: Infectividade. Promastigotas. *Leishmania*. Macrófagos. Virulência

1 Laboratório de Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brasil.

2 Laboratório de Bioquímica – Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil.

Endereço para correspondência. Antonia Maria Ramos Franco, Laboratório Leishmaniose e Doença de Chagas, Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. Av. André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus, AM, Brasil. E-mail: afranco@inpa.gov.br e lilianecr76@gmail.com.

Diversos processos e um variado número de substâncias estão envolvidos na adesão, penetração e sobrevivência do parasito na célula hospedeira do mamífero. O entendimento desses

eventos auxilia na compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na infectividade/virulência dos protozoários do gênero *Leishmania* podendo contribuir na descoberta e desenvolvimento de produtos que bloqueiem esse ciclo infectivo.

No presente estudo buscou-se avaliar “*in vitro*” e “*in vivo*” a infectividade de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* recém-isoladas e após várias passagens *in vitro*. Sendo assim, dois grupos de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/PA/67/PH8) foram utilizados neste estudo: (pLi=promastigotas de *Leishmania* infectivas) promastigotas recém-isoladas de lesões de hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados e (pLni=promastigotas de *Leishmania* não infectivas) formas obtidas após subcultivo axênico de repiques de cinco dias e com mais de noventa passagens *in vitro*.

Na confirmação da infectividade das amostras, foi realizado o acompanhamento das cepas em dois sistemas biológicos, *in vivo* pela inoculação em animais de laboratório suscetíveis a infecção (hamsters) e *in vitro*, em sistemas celulares (macrófagos de linhagem celular murina J774).

A amostra foi caracterizada como *L. amazonensis* por análise isoenzimática de acordo com o protocolo descrito por Figueira et al. (2008) e as promastigotas isoladas, mantidas e amplificadas em cultivo axênico a 25° C pH 7,4 em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) completo [suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi/Gemini Bio-Products) e 50 µg/mL de gentamicina (Neo Química)] em estufa BOD (Mohetson Scientific).

A curva de crescimento foi iniciada pela inoculação de 3×10^6 parasitos/mL em 5mL de RPMI 1640 completo. As promastigotas foram coletadas no final da fase logarítmica de cultivo (5º dia de cultivo), lavadas com água Milli Q estéril e sedimentadas por centrifugação a 3100 x g por 10

minutos. A quantificação parasitária foi determinada pela contagem das células em câmara de Neubauer (W - Germany). Um total de 10^6 promastigotas em 0.1mL de salina foi inoculado na pata traseira direita de dez hamsters que foram observados semanalmente para o surgimento de lesões cutâneas. Depois de um ano de acompanhamento, foram realizadas biópsias, nos locais do inóculo, para impressão em lâminas coradas pelo método de Giemsa. Além disso, foi realizada semeadura das biópsias das lesões em meio NNN (Novy e MacNeal, 1904; Nicolle, 1908) para confirmação da ausência de parasitismo.

Para os ensaios *in vitro*, foram utilizados macrófagos murinos da linhagem J774 cedidos pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) mantidos a 37°C com 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 completo como descrito por Doyle e Dwyer (1993). A cada dois dias, foi realizada a renovação dos meios de cultura, lavando-se as células com meio sem soro, acrescentando-se meio RPMI 1640 completo.

Os macrófagos cultivados foram centrifugados e quantificados em câmara de Neubauer (W - Germany) e o número de células ajustado para 10^6 /mL. Em placas de seis poços (Nuclon), cada uma contendo lamínula de 24x24mm, foram adicionadas 10^6 células em meio RPMI 1640 completo num volume final de 2mL. Foram então incubadas por 24 horas a 37°C para total aderência dos macrófagos à lamínula.

Após incubação, as células foram infectadas acrescentando-se ao meio as formas promastigotas de *L. amazonensis* (pLi) e pLni. Foram acrescentados a cada poço teste contendo macrófagos, 5×10^6 promastigotas de formas pLi, 1×10^8 ou 5×10^6 formas pLni. O meio com os parasitos foi mantido em contato com os macrófagos por quatro horas.

Após esse período, o sobrenadante foi removido e o meio RPMI renovado. Após 24h, o sobrenadante foi desprezado e as lamínulas coradas pelo Kit Panótico (Laborclin). Realizou-se então a contagem dos macrófagos infectados e o número de formas amastigotas interiorizadas para análise da infectividade.

Na avaliação do perfil protéico das amostras pLi e pLni por SDS-PAGE, foram analisadas amostras de *L. amazonensis* de 3^a, 9^a, 11^a, 13^a, 14^a, 16^a, 18^a passagens *in vitro* e amostras com 24 meses de manutenção em meio de cultivo axênico. Para isso, 2×10^8 parasitos foram ressuspensos em 100 μ L de PBS (solução salina tamponada) contendo 0,4% de CHAPS. As amostras foram incubadas a 0°C por uma hora e em seguida, centrifugadas a 39.500 g por 1h. O sobrenadante obtido foi ressuspensão em tampão da amostra contendo 5% de β -mercaptoetanol, fervido por 5 minutos e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Os resultados do gel SDS-PAGE demonstraram que os perfis protéicos de promastigotas virulentos e avirulentos são distintos quanto à expressão de várias proteínas, conforme observado na figura 1.

Durante o acompanhamento da infecção nos animais de laboratório, observou-se o surgimento de lesões nos locais de inoculação nos animais experimentais, três semanas após o inóculo com a amostra pLi, confirmando assim sua capacidade de infectar um hospedeiro suscetível. Nos animais inoculados com as amostras pLni, acompanhados por mais de um ano, não houve desenvolvimento de lesões cutâneas e nem a presença de parasitos nos locais de inóculo, confirmado através de reisolamentos em cultivo.

Os resultados demonstraram que quando os macrófagos foram incubados na presença de 5×10^6 pLi, cerca de 15,25% dos macrófagos estavam infectados com formas amastigotas. Nos macrófagos incubados com 1×10^8 e 5×10^6 pLni nenhuma célula foi encontrada infectada após

24h de incubação. Na determinação do número de amastigotas por macrófago foi detectado uma média de 1,6 amastigotas no grupo de inóculo de 5×10^6 para a amostra infectiva e zero para forma não infectiva.

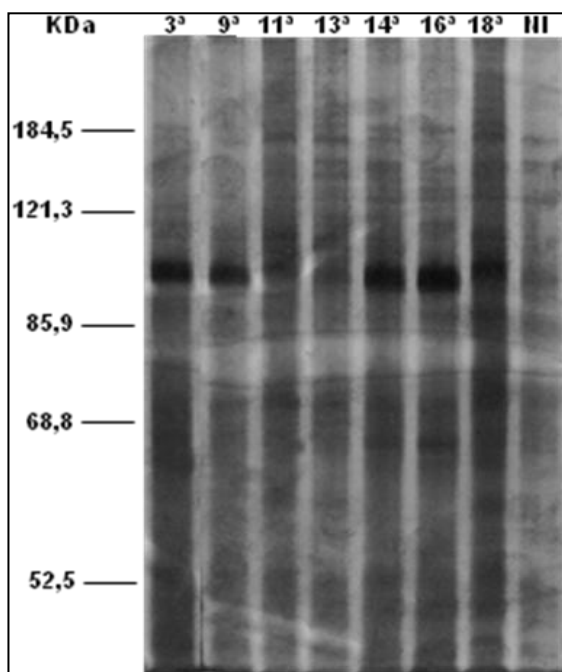


Figura 1 - Perfil eletroforético de proteínas expressas em amostras de promastigotas de *Leishmania amazonensis* de 3ª, 9ª, 11ª, 13ª, 14ª, 16ª, 18ª passagens *in vitro* e III- formas promastigotas de *Leishmania* não infectiva com mais de 90 passagens sucessivas *in vitro*. KDa = padrão de massa molecular.

O sucesso da infecção em *Leishmania* está relacionado, além de outros fatores, a: (i) sobrevivência do parasito ao processo de fagocitose que envolve a invasão em células-alvo, (ii) inibição da formação do fagolisossomo e a remoção dos radicais hidroxilas e ânions superóxidos, (iii) inibição da degradação das enzimas do fagolisossomo, (iv) transformação em amastigotas que são mais resistentes às enzimas óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e (v) ao pH ácido do fagolisossomo (REIS et al., 2006).

Em conclusão os resultados da infecção experimental demonstraram diferenças na capacidade de infecção das amostras em estudo. Ao longo de diversas passagens *in vitro* essa

capacidade foi reduzida a ponto de não ser capaz de infectar nem células de linhagem de macrófagos nem hospedeiros mamíferos suscetíveis a infecção.

ABSTRACT

Influence on the infectivity of promastigotes of *Leishmania amazonensis* after successive passages in culture

This study was conducted to evaluate the infectivity of promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* maintained in culture for a long time by *in vivo* and *in vitro* models, compared with freshly isolated populations. After cultivation for 24 months, promastigotes lost the ability to infect and produce skin lesions in experimental animals, as well as, phagocytes line J774, unlike that observed with freshly isolated promastigotes. The loss of virulence of promastigotes grown continuously probably due to selection in the sample initially stable and virulent in a population of totally avirulent promastigotes.

KEYWORDS: Infectivity. Promastigotes. *Leishmania*. Macrophages. Virulence

REFERÊNCIAS

1. Doyle PS, Dwyer DM. *Leishmania*: Immunochemical comparison of the secretory (extracellular) acid phosphatases from various species. *Exp Parasitol* 77: 435-444, 1993.
2. Figueira LP, Zanotti M, Pinheiro FG, Franco AMR. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 512-514, 2008.
3. Nicole GL. Culture du parasite du Bouton d'Orient. *CR Acad Sci* 146: 842-843, 1908.
4. Novy FGE, Macneal WJ. On the cultivation of *Trypanosome brucei*. *J Infect Dis New York* 1: 1-30, 1904.
5. Reis LC, Brito MEF, Souza MA, Pereira VRA. Mecanismos imunológicos na resposta celular a humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Patol Trop* 35: 103-115, 2006.

4. CAPÍTULO II

**INFLUÊNCIA NA INFECTIVIDADE DE PROMASTIGOTAS DE
LEISHMANIA AMAZONENSIS APOS SUCESSIVAS PASSAGENS EM CULTIVO**

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS NAS FORMAS PROMASTIGOTAS INFECTIVAS E NÃO INFECTIVAS DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS*

Liliane Coelho da Rocha^{a,*}, Flavia Regina Almeida Campos^b, Alana Cristina Vinhote-Silva^a, Luanda de Paula Figueira^a, Antonia Maria Ramos Franco^a

^aLaboratory of Leishmaniasis and Chagas Disease, National Research Institute of Amazonas - INPA, 69060-001, Manaus, Amazonas, Brazil

^bBiochemistry Laboratory - Federal University of Amazonas – UFAM, Manaus, Amazonas, Brazil

The running head: Infective and non-infective promastigote of *Leishmania amazonensis* proteomics

Abbreviations: 2-DE, Two-dimensional gel electrophoresis.

***Corresponding authors.** Laboratory of Leishmaniasis and Chagas Disease. INPA. Av. André Araújo, no. 2936 – Aleixo, CP. 478, CEP. 69060-001, Manaus-Amazonas, Brazil. Tel: +55 92 3643 3065. Fax: +55 92 3643 3061. E-mail addresses: lilianecr76@gmail.com (L. Rocha) and afranco@inpa.gov.br (A. Franco)

RESUMO

O desenvolvimento das infecções por *Leishmania* é determinado pela espécie do parasita, por características do hospedeiro vertebrado e pelas suas características genéticas. Embora muitos aspectos da resposta imune a esse parasita já sejam conhecidos, há ainda uma falta de conhecimento relacionada a características do próprio parasita que estejam relacionadas à infecção. A conclusão recente da sequência genômica nos projetos *L. major* e *L. infantum*, bem como de outras espécies do gênero, aliadas ao avanço simultâneo da proteômica, acelerou e favoreceu de forma significativa o estudo de novas proteínas em *Leishmania*. O uso da técnica proteômica para o estudo de proteínas de *Leishmania* relacionadas a infectividade, através do uso de mapas 2-DE para detecção dos perfis de expressão proteica das formas infectivas e não infectivas de *L. amazonensis* foram utilizados nesse estudo. Foram detectados 251 e 145 “spots” proteicos diferentes nas formas infectiva e não infectiva das promastigotas respectivamente. Enquanto a grande maioria dos spots apresentam distribuição e intensidade similares, poucos são computacionalmente e preferencialmente expressos na forma não infectiva quando comparada com a forma infectiva. Esses dados confirmam a exequibilidade de se fazer uma varredura do perfil proteico de um organismo relacionado a sua infectividade/virulência baseada nos perfis proteicos em 2-DE. Essa possibilidade abre uma janela para futuros estudos de fatores de virulência em *Leishmania* utilizando-se a tecnologia proteômica.

Palavras-chave: *Leishmania*; Leishmaniose; análise proteômica; infectividade; Eletroforese bidimensional em gel; espectrometria de massa.

1. INTRODUÇÃO

Leishmania é um protozoário da ordem Kinetoplastida, parasita intracelular obrigatório, que causa um grupo de doenças coletivamente conhecidas como leishmanioses que afetam milhões de pessoas ao redor do mundo [1]. As leishmanioses estão entre as seis doenças prioritárias do programa de controle de doenças da Organização Mundial de Saúde. É uma doença endêmica em 88 países com 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões em risco (<http://www.who.int/en/>). Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imunológica do hospedeiro, três formas clínicas básicas da doença podem ser encontradas: a leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral [2,3]. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é amplamente distribuída pelo continente Americano, ainda que sua prevalência não seja bem definida devido a fatores como a falta de notificação [4].

Durante o ciclo de vida, os parasitas alternam entre duas formas principais: as promastigotas no intestino do inseto vetor, e as amastigotas no interior dos macrófagos do hospedeiro mamífero. As promastigotas, durante sua migração pelo trato digestório do inseto vetor, sofrem uma série de modificações morfológicas e moleculares (nectomonas, haptomonas e paramastigotas), culminando com sua transformação da forma procíclica (não infectiva) para a forma de promastigota metacíclica que não se divide, essa forma infectiva vive no aparelho bucal do inseto vetor e é transmitida ao hospedeiro vertebrado [5,6]. Este processo conhecido como metaciclogênese pode ser mimetizado *in vitro*. Foi observado que promastigotas na fase estacionária de cultivo estão diferenciadas na forma metacíclica [7,8]. As formas promastigotas podem ser facilmente obtidas de culturas axênicas. Foi verificado que as promastigotas infectivas

mantidas por longos períodos em cultivo *in vitro*, sem passagem cíclica *in vivo*, tendem a perder a infectividade [9-12].

A infecção do hospedeiro vertebrado tem início quando promastigotas metacíclicas de *Leishmania* são transmitidas pela picada do inseto vetor. No hospedeiro mamífero, promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e internalizadas no fagolisossoma onde ficam expostas a enzimas, peptídeos antimicrobianos e intermediários reativos de oxigênio (ROI) gerados pela ativação da NADPH oxidase [13,14].

De forma interessante, apesar de encontrar-se em um ambiente extremamente hostil, alguns parasitas são capazes de superar essas condições e de se converterem em amastigotas intracelulares, resultando no progresso da infecção. Vários mecanismos estão envolvidos nesse processo. As promastigotas metacíclicas interagem com os mecanismos de defesa do hospedeiro (imunológicos e bioquímicos) e isso culmina na morte ou sobrevivência do parasita. Nessa interação, algumas proteínas podem ser expressas na superfície do parasita determinando a infectividade da forma metacíclica. Devido à importância dessas moléculas, na interação parasita-hospedeiro, várias tentativas foram feitas para compreender melhor sua participação nessa interação bem como caracterizar essas moléculas em termos estruturais e funcionais [15-17].

Nas últimas décadas, várias moléculas que apresentam um papel na biologia do parasita e em sua infectividade foram identificadas. Duas moléculas mais abundantes de superfície, lipofosfoglicano (LPG) e a metaloprotease contendo zinco GP63 [18], são as mais estudadas. A GP63, uma glicoproteína de superfície extremamente abundante, expressa nas duas formas morfológicas de *Leishmania*, está ancorada a membrana plasmática via glicosilfosfatidilinositol [19, 20]. Essa enzima é ativa sobre uma série de substratos protéicos [21,22]. Devido a sua abundância e a sua localização, os glicoconjugados de *Leishmania*, em particular o LPG, são

importantes fatores de virulência em *L. major* e *L. donovani* [23-26], no entanto, LPG não afeta a virulência em *L. mexicana* demonstrado por estudos com mutantes com alteração na síntese de LPG [27, 28].

Outras moléculas envolvidas na biossíntese de LPG, por exemplo, fosfomanose isomerase em *L. mexicana* [29], LPG1 em *L. major* [26] e galactosiltransferase em *L. donovani* [30] também estão associadas com a virulência. Outros fatores foram descritos, entre eles, uma família de cisteíno proteases [31], proteína quinase ativada por mitógeno [32], gene A2 [33], tripanotiona redutase [34], proteína de choque térmico 100 [35] e proteínas codificadas pelo cDNA16 de *L. mexicana* [36]. A caracterização dessas moléculas tem implicações importantes para o desenvolvimento de novas terapias ou vacinas contra parasitas do gênero *Leishmania*. O presente trabalho reporta a expressão diferencial de proteínas em promastigotas efetivas e não infectivas de *L. amazonensis* usando análise proteômica. .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Parasitas e cultivo *in vitro*

As amostras de *L. amazonensis* (IFLA/PA/67/PH8) foram obtidas de duas fontes. A forma infectiva foi isolada de tecidos de lesões de animais infectados e a forma não infectiva foi obtida no quinto dia de cultivo de culturas axênicas com mais de 90 passagens *in vitro*.

Para confirmar a infectividade das amostras, as linhagens foram acompanhadas em dois sistemas biológicos: *in vivo* pela inoculação em animais de laboratório susceptíveis a infecção (hamsters/*Mesocricetus auratus*) e em sistema celular *in vitro* (macrófago murino linhagem celular J774).

A linhagem foi caracterizada como *L. amazonensis* através de eletroforese de isoenzimas de acordo com o protocolo descrito por Figueira et al. [37]. As promastigotas foram isoladas, amplificadas e mantidas em meio de cultura axênico a 25 °C pH 7.4 em RPMI 1640 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado [iFBS] (Gemini Bio-Products) e 50 µg/mL de gentamicina (Neo Chemical). Curvas de crescimento foram iniciadas com a inoculação de 3×10^6 parasitas/mL em 5 mL de RPMI 1640-10% iFBS. As promastigotas foram coletadas no final da fase logarítmica do cultivo (quinto dia de cultivo), Lavados com água Milli Q estéril e centrifugados a 3100 g por 10 min. A densidade dos parasitos foi estimada pela contagem em hemocitometro.

2.2- Ensaio *In vivo*

Promastigotas foram inoculadas (10^6 /0.1mL) na pata posterior direita de 10 hamsters que foram então observados semanalmente em relação ao aparecimento de lesões na pele. Depois de um ano de acompanhamento, biópsias dos animais foram realizadas nos sítios de inoculação para confirmar a ausência de parasitismo, por re-isolamento em meio de cultura bifásico NNN [38, 39] e cortes histológicos corados com Giemsa.

2.3- Ensaio *In vitro*

Macrófagos murinos da linhagem J774 mantidos a 37°C com 5% CO₂ em meio RPMI-1640 suplementado com 10% iFBS [40], foram usados para ensaios *in vitro*. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias, as células foram lavadas com meio sem iFBS e em seguida foi adicionado meio RPMI completo. Os macrófagos cultivados foram centrifugados e quantificados em hemocítômetro e o número de células ajustado para 10⁶/mL. Em placa de seis poços (Nuclon), cada poço contendo uma lamínula de 24x24mm, 10⁶ células foram aderidas em meio RPMI completo em um volume final de 2 mL.

As células foram incubadas por 24 h a 37 °C para completa adesão dos macrófagos. Depois da incubação, células foram infectadas pela adição do meio com promastigotas infectivas ou não infectivas de *L. amazonensis*, 5x10⁶ promastigotas infectivas (iLa) ou 1x10⁸ e 5x10⁶ promastigotas não infectivas (niLa) foram adicionadas a cada poço contendo macrófagos. O meio contendo os parasitas foi mantido em contato com os macrófagos por 4 horas. Depois desse tempo, o sobrenadante contendo os parasitas foi removido de cada poço, e o meio RPMI renovado.

Depois de 24 h, os sobrenadantes foram transferidos para o meio NNN e as lamínulas coradas pelo kit Panótico (Laborclin). O número de macrófagos infectados e as amastigotas internalizadas foram contados para análise da infectividade.

2.4- Extração de proteínas

Os extratos foram obtidos simultaneamente para cada par de amostras (infectiva/ não infectiva). Formas promastigotas (10⁹ células) foram obtidas em meio RPMI completo e lavadas

três vezes com água Milli por centrifugação, ressuspensos em tampão de lise (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% CHAPS, 4 mM Tris HCl pH8,0 e 2% do cocktail de inibidores de proteases) e centrifugados a 21,000 g por 2 minutos a 4 °C. O sobrenadante (extrato protéico) foi mantido a -80 °C até o uso. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford [41].

2.5- Eletroforese

Para análises preliminares dos extratos protéicos, foram preparados géis unidimensionais de poliacrilamida a 15%. As amostras foram solubilizadas em tampão da amostra. (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.001% azul de bromofenol e 5% β-mercaptoetanol) e fervidas a 100 °C por 5 min. A corrida foi feita a 200 V a temperatura ambiente (RT) e os géis corados por Comassie Coloidal Brilliant Blue G-250 [42].

A focalização isoeétrica (FI) para a 2-DE foi realizada usando o aparato IPGphor (Ettan IPGPhor 3/GE Healthcare). Alíquotas de 60 µL (4×10^8 promastigotas) de proteína foram diluídas em um volume final de 250µL em solução de reidratação (DeStreak™ rehydration solution/GE Healthcare) com 2% de tampão IPG ph 4-7. As amostras foram aplicadas nas fitas com gradiente de pH imobilizado (IPG) (13-cm pH 4-7 linear; GE Healthcare) para reidratação no gel. A reidratação passiva foi feita a 50µA por 12 h a 20° C, seguida de reidratação ativa na focalização isoeétrica (50 µA/IPG strip, 0.5% IPG buffer, 20° C, de acordo com instruções do fabricante).

Após a focalização, as fitas foram estocadas a -80° C por no máximo uma semana, ou aplicadas diretamente sobre o gel da segunda dimensão. Após a FI, cada fita foi equilibrada por 20 min em 5 mL de solução de equilíbrio (Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v)

glicerol, 2% (w/v) SDS, 0.002% BPB) adicionado com 125 mM de DTT, seguido de uma Segunda etapa de incubação com a mesma solução de equilíbrio com 125 mM de iodacetamida.

Após o equilíbrio, a separação na segunda dimensão (de acordo com a massa molecular) foi feita por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12,5%, e corrida em Hoefer™ SE 600 Ruby™ (GE Healthcare) conectado a uma fonte Electrophoresis Power Supply/EPS601 (GE Healthcare). A eletroforese foi realizada em tampão Tris/Glicina/SDS de acordo com as condições descritas por O'Farrel [43]. Os géis foram corridos a 40 mA/gel a 15°C até a chegada do corante ao final do gel. Após a eletroforese os géis foram corados por Comassie Coloidal Brilliant blue G-250 segundo procedimento descrito [42].

2.6- Análise de imagens 2DE

As imagens dos géis bidimensionais foram digitalizadas a partir dos géis corados usando ImageScanner™III (GE Healthcare). As imagens geradas foram analisadas usando o programa ImageMaster™ 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare). Géis consenso foram criados a partir de três replicatas do gel por condição.

Os pontos apresentando pelo menos a diferença de duas vezes no volume foram considerados como diferencialmente expressos. A análise da expressão dos spots foi processada usando parâmetros percentuais de volume pelo programa ImageMaster™ 2D Platinum v6.0. A autenticidade e relevância de cada spot foram validadas por inspeção visual e editadas quando necessário.

A intensidade de cada spot proteico foi normalizada relativa à abundância total de todos os spots válidos. Após a normalização e a subtração do background, um grupo de géis foi criado

para cada condição (três réplicas de cada amostra). A análise diferencial foi feita comparando-se a quantidade de spots em cada condição (amostras infectivas x não infectivas).

2.7- Digestão das proteínas e espectrometria de massa ESI-QToF (Electrospray Ionization)

Os Spots com expressão diferencial foram selecionados. Esses spots foram excisados, reduzidos, alquilados e submetidos a digestão in gel com tripsina [44]. Uma alíquota (4.5 μ L) da mistura resultante de peptídeos foi separada em resina C18 (75 μ m x 100 mm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters) acoplada a um espectro de massa Q-ToF Ultima (Waters) com fonte de nano eletrospray a uma taxa de fluxo de 0.6 mL/min. O gradiente foi de 2-90% de acetonitrila em 0.1% de ácido fórmico por 20 min. O instrumento foi operado no modo 'top three', no qual um espectro MS é obtido, seguido por MS/MS dos três picos mais intensamente detectados.

Os espectros resultantes foram processados utilizando o software Mascote Distiller 2.2.1.0, 2008, Matrix Science (MassLynx V4.1) e comparados com o banco de dados de proteínas do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando o software Mascote, com a carbamidometilação com uma modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável, permissão de até uma clivagem de tripsina perdida e uma tolerância de 0.1 Da para precursor e fragmentos de íons.

3. RESULTADOS

3.1- Ensaios *in vivo*

Os resultados da infecção experimental *in vivo* e *in vitro* (infectividade em macrófagos e SDS-PAGE) confirmaram as diferenças entre promastigotas infectivas e não infectivas. Em ensaios *in vivo*, o aparecimento da lesão no sítio da inoculação nos animais experimentais foi observado três semanas após a inoculação da amostra infectiva, assim confirmando sua habilidade de infectar um hospedeiro susceptível. Animais inoculados com niLa foram acompanhadas para o aparecimento de lesões por mais de um ano. Nenhum dos animais apresentou lesão. Também não foi possível isolar parasitas dos sítios de inoculação. No grupo de macrófagos no qual foram inoculadas 5×10^6 promastigotas iLa, 15.2% foram infectados, com a presença de 1.6 amastigotas por macrófago. Em macrófagos incubados com 5×10^6 promastigotas niLa, nenhuma célula foi encontrada infectada após o período de incubação (Figura 1).

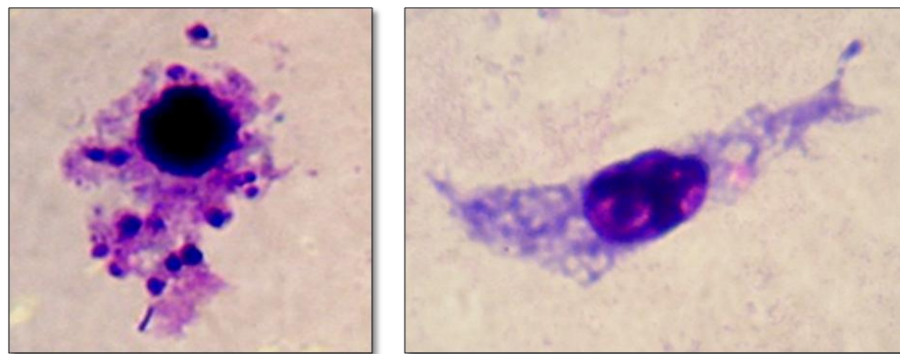


Figura 1 - Avaliação da infecção *in vitro* de macrófagos murinos de linhagem celular (linhagem J774) 24h após incubação com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infectiva (Llai) e não-infectiva (Lla ni). Imagem da esquerda mostra várias amastigotas no interior do macrófago enquanto que a imagem a direita ilustra a ausência de amastigotas (Lla ni) nas células fagocíticas.

3.2- Análise de proteínas

Os mapas bidimensionais obtidos de iLa e niLa mostraram expressão marcante de spots ácidos com M_r acima de 20 kDa em ambas as formas promastigotas (Figura 2). Visualmente, os perfis protéicos em IPGs 4-7 mostraram-se bastante similares com diferenças de intensidade em vários spots.

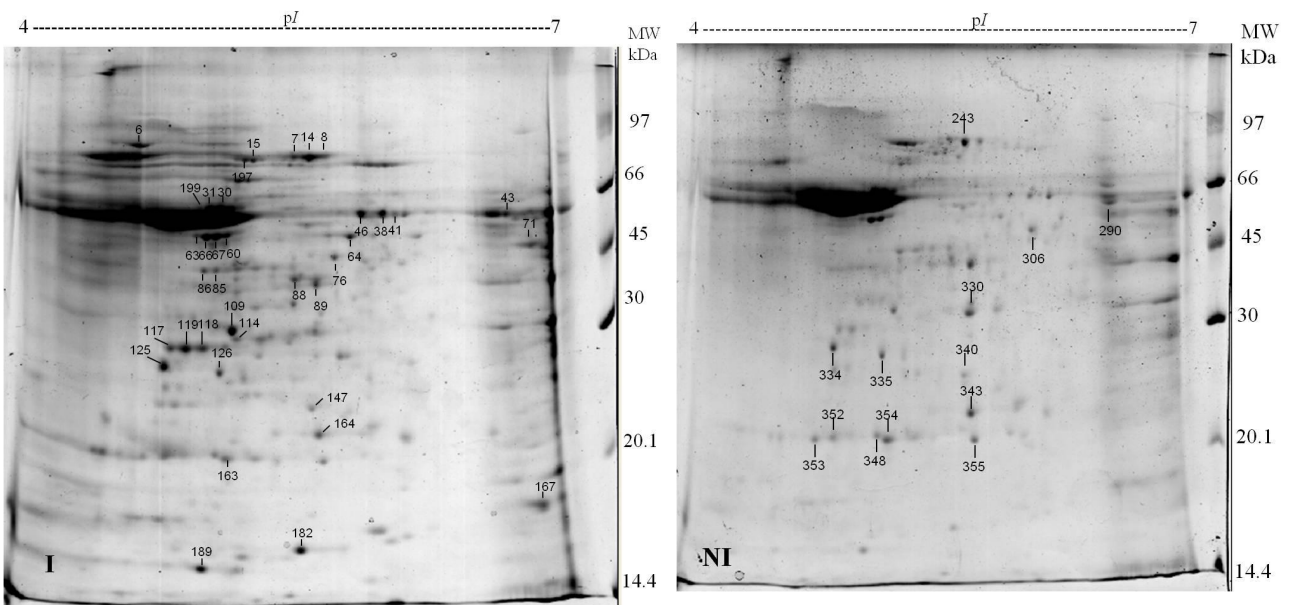


Figura 2 - Análise comparativa do perfil protéico (extrato total, 10^9 parasitas) obtidos após separação por 2-DE (1a dimensão: IEF pH 4-7 gradiente linear e 2a dimensão: 15 % SDS-PAGE) de promastigotas infectivas (I) e não-infectivas (NI) de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Proteínas foram extraídas em tampão de lise (7M uréia/2M tiouréia) analisado por IEF a pH 7.4 e corado com comassie coloidal Brilliant Blue G-250. Spots protéicos foram identificados por espectrometria de massa por ESI-Qtof, numerados e suas identidades dadas na tabela 1.

O perfil unidimensional mostrou níveis diferentes de expressão entre as promastigotas infectivas e não infectivas. Uma maior quantidade de bandas com diferentes massas moleculares (acima de 30 kDa) foram detectadas na forma infectiva, o que é confirmado na análise pelo gel bidimensional (Figura 3). No perfil protéico da forma infectiva foram revelados um total de 251 spots, comparados com 145 spots na forma não infectiva. A similaridade entre os géis em ambas

as condições foi de 52.5%, sendo detectados 104 spots similares. A análise comparativa das imagens revelou 147 spots com expressão específica na forma infectiva e 41 spots específicos da forma não infectiva. 22 e 19 spots de proteínas distintas foram detectados nas formas promastigotas iLa e niLa, respectivamente. Enquanto a grande maioria dos spots apresentou intensidade similar, poucos foram computacionalmente e preferencialmente expressos em promastigotas não infectivas quando comparadas com as formas infectivas. Esses dados confirmam a exequibilidade de se criar uma varredura do perfil protéico baseado na 2-DE relacionado à infectividade/virulência de espécies de *Leishmania* fornecendo uma base para o desenvolvimento de futuros estudos sobre fatores de virulência no proteoma de *Leishmania*.

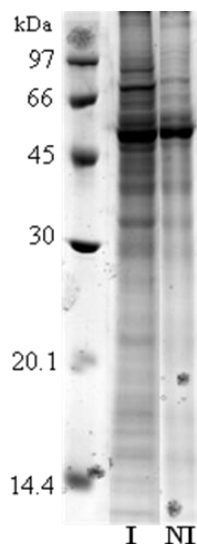


Figura 3 – Perfil unidimensional de promastigotas infectivas (I) e não-infectivas (NI) de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* separadas por SDS-PAGE 15% e corados por Coomassie Blue coloidal. O gel revelou grande quantidade de bandas de alta massa molecular principalmente na forma infectiva.

Do número total de spots revelados pela eletroforese bidimensional, 67 foram separados e digeridos para identificação por espectrometria de massas. A análise por ESI-Q Tof de 67 spots de promastigotas de iLa e niLa (Tabela 1) resultaram na identificação de 23 proteínas (73% dos

spots) de nove categorias funcionais. Seus papéis foram obtidos da literatura onde se encontrou que algumas dessas proteínas realizam múltiplas funções (Tabela 2).

Proteínas com papel conhecido relacionado à motilidade celular foram encontradas em abundância nas promastigotas infectivas [45]. Essas incluem α e β tubulina e actina representando 10 do número total de spots identificados. Outro grupo bem representado nesse estudo foi HSP70, envolvida no enovelamento de proteínas. Essas proteínas estão implicadas como potenciais fatores de virulência de *L. donovani* [46] e têm papel importante na gênese do fenótipo resistente a antimoniais em parasitas do gênero *Leishmania* [47].

Um total de seis spots identificados como HSP70 foram encontrados em ambas as condições com expressão maior em amostras infectivas (Figura 4) representando o segundo maior número de spots (12.2%) seguindo α e β tubulina (18,3%). Outra proteína de choque térmico conhecida como HSP83 está presente na forma infectiva (Figura 5). Essa proteína também está envolvida no enovelamento de proteínas e pode ter papel importante no processo de infecção do hospedeiro mamífero, por burlar a resposta imune, alterando a ativação de células imunes não específicas, levando a imunossupressão ou mesmo provocando uma resposta imune contra patógenos invasores [48].

Um grupo com funções diversas em vários protozoários e encontrada apenas em promastigotas infectivos de *L. amazonensis* foi a proteína nucleosídeo difosfato quinase (NDK). Esta enzima participa do metabolismo de salvamento de purinas que é essencial na sobrevivência do parasito [96].

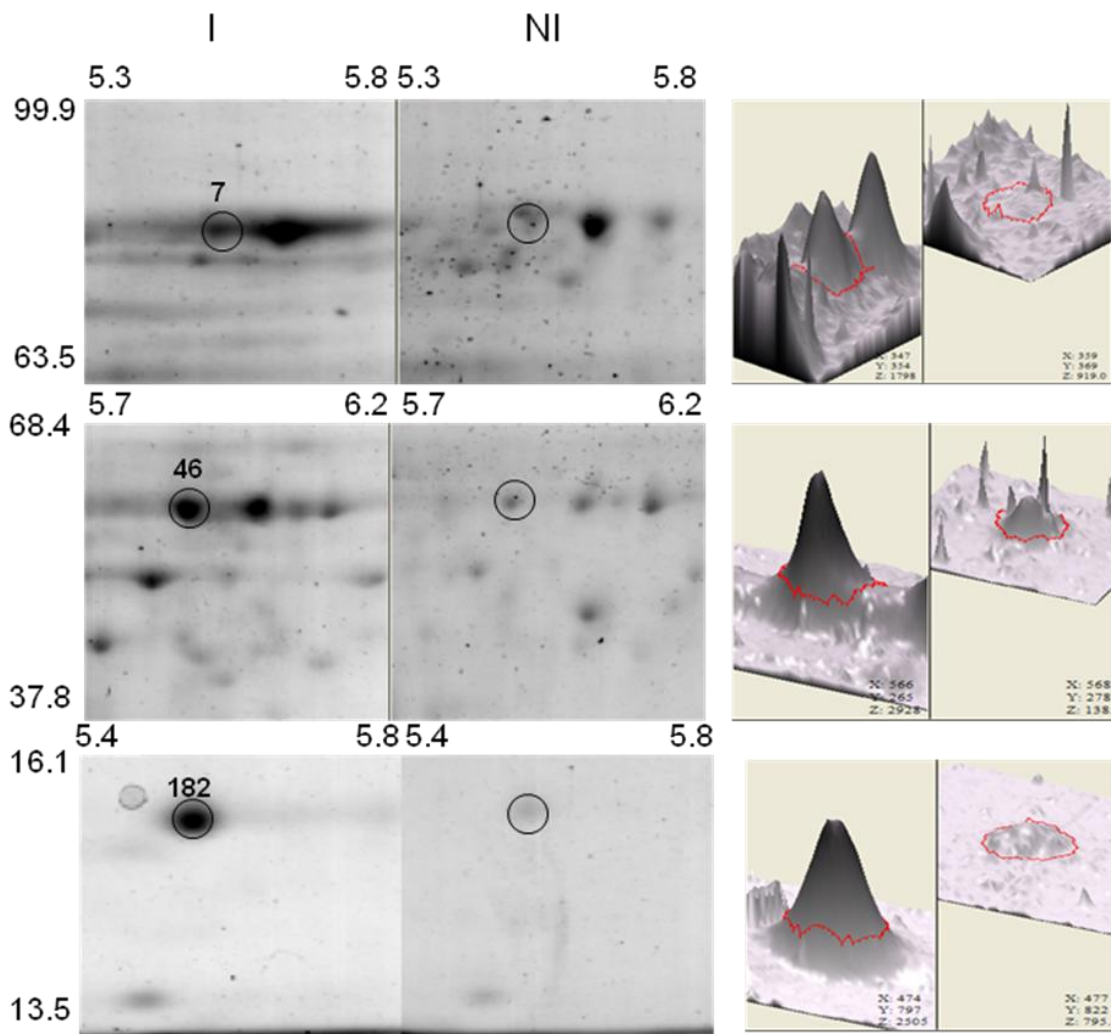


Figura 4 – À esquerda seções dos géis 2-DE mostrando spots ampliados diferencialmente expressos entre promastigotas infectivas (I) e não-infectivas (NI) de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Número dos spots: 7 – HSP70 ; 46 – Tripanotiona reductase; 182 - Triparedoxina citosólica. À direita as imagens 3D dos spots mostrando a expressão diferencial em cada condição estudada.

Quatro spots protéicos foram identificados como proteína dissulfeto isomerase (PDI) estando presentes em ambos os estágios, com ligeira diminuição na forma não infectiva (Figura 5). Também participam do enovelamento de proteínas como enzimas tiol-oxireductases que catalisam as trocas tiol-dissulfeto. Elas asseguram o enovelamento adequado e conformação das

proteínas, agindo como co-receptores na reorganização celular, toxicidade celular e enovelamento incorreto de proteínas [49-51].

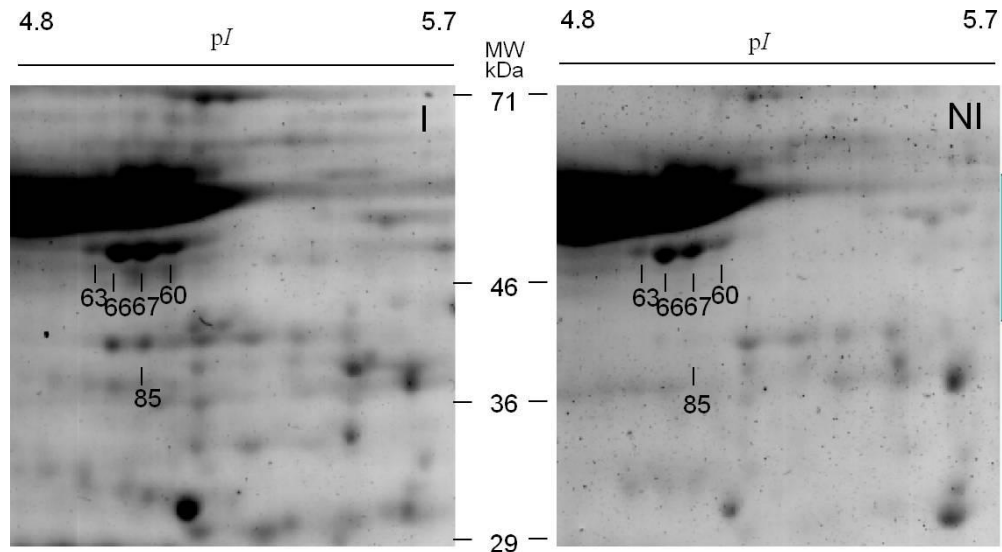


Figura 5 - Seções dos géis 2-DE mostrando spots ampliados diferencialmente expressos entre promastigotas infectivas (I) e não-infectivas(NI) de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Número de spots: 60, 63, 66, 67 – proteína dissulfeto isomerase 52 kDa (PDI); 85 – proteína de choque térmico de 83 kDa (HSP83).

Proteínas envolvidas na síntese protéica também foram identificadas. De particular interesse é o fator de alongamento 1 β (EF-1 β). Em adição ao seu papel na síntese de proteínas, o complexo EF-1 está envolvido em outros processos celulares como a transdução de sinal, apoptose [52], e na sobrevivência das amastigotas nos macrófagos [53]. Outro fator de alongamento EF-1 α foi identificado no gel bidimensional somente nas formas promastigotas infectivas. De acordo com estudos prévios, esse fator foi classificado como candidato a fator de virulência em *L. donovani* por sua interação seletiva com tirosina fosfatase-1 (SHP-1) que leva a inativação dos macrófagos [53].

Tabela 1 – Proteínas identificadas no banco de dados Mascot® em géis 2-DE de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* por espectrometria de massa (ESI-QTOF).

n° Spot	Nome da proteína	Código de acesso NCBI	PM (kDa)	Valor do pI Calculado	Valor Mascot	% Cobertura	Macht/no peptídeos	Sequência de peptídeos
6	heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 14609396 6	72089	5.80	282	11	8/38	DAGVELKEINDVVLVGGMTR, EINDVVLVGGMTR, EINDVVLVGGMTR, GLVLLDVTPLSLGIETLGGVFTR, KSQTFSTAADNQTQVGIK, SQTFFSTAADNQTQVGIK, ELVEVRNNAETQLTTAER
7	heat shock protein 70 [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 293059	71382	5.46	111	5	4/120	AVVTVPAYFNDSQR, QATKDAGTISGLEVLRL, AGTISGLEVLRL, NTTIPTKK
8	heat shock protein 70 [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 293059	71382	5.46	99	4	4/107	QATKDAGTISGLEVLRL, DAGTISGLEVLRL, STIQPVER, NTTIPTKK
14	heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 14609397 4	72119	5.70	1847	46	48/132	VLENSEGFR, VLENSEGFRTTPSVVAFK, TTPSVVAFKGGSEK, GSEKLVGLAAK, LVGLAAKR, QAITNPQSTFYAVK, QAITNPQSTFYAVKR, QAITNPQSTFYAVKR, RFEDEHIQK, EDEHIQK, NVPYKIVR, MKETAENFLGHK, MKETAENFLGHK, VSNVVTCPAYFNDAQR, QATKDAGTIAGLNVIR, DAGTIAGLNVIR, DAGTIAGLNVIR, VVNEPTAAALAYGMDK, VVNEPTAAALAYGMDK, VNEPTAAALAYGMDKTK, TSGIDLSE, TSGIDLSKEM, TSGIDLSKER, SKFEGITQR, SKFEGITQR, LIDRSIAPCK, SIAPCKQCMK, EINDVVLVGGMTR, EINDVVLVGGMTR, VEEVKK, FFQKDPFR, GVPNDEAVALGAATLGGVLR, GVPNDEAVALGAATLGGVLR, GVPNDEAVALGAATLGGVLRGDVK, GVPNDEAVALGAATLGGVLRGDVK, GLVLLDVTPLSLGIETLGGVFTR, GLVLLDVTPLSLGIETLGGVFTR, NTTIPTKK, SQTFFSTAADNQTQVGIK, VFQGEREMAADNQQMMGQFDLVGIPPAPR, VFQGEREMAADNQQMMGQFDLVGIPPAPR, VFQGEREMAADNQQMMGQFDLVGIPPAPR, VFQGEREMAADNQQMMGQFDLVGIPPAPR, VFQGEREMAADNQQMMGQFDLVGIPPAPR, EMAADNQQMMGQFDLVGIPPAPR, NNAETQLTTAER, TLVAELR, LVAELRK
15	heat shock protein 70 [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 293059	71382	5.46	77	4	3/126	DAGTISGLEVLRL, VQSLVSDFFGGK, VQSLVSDFFGGKELNK
30	ATPase beta subunit [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 14608880 6	56485	5.14	881	32	29/74	CIAMQTTDLLL, CIAMQTTDLLL, CIAMQTTDLLKLS, VVSTGGNISVPVGR, VVSTGGNISVPVGR, IFNVLGDAIDQR, IFNVLGDAIDQRGPVGM, GPVGEKMR, MAIHAEAPL, MAIHAEAPL, MAIHAEAPL, MAIHAEAPL,

									LADQAAEDTILTTGIV, EGTDLYLEMMQSV, EGTDLYLEMMQSV, EGTDLYLEMMQSV, VIDLKGESC, CVLVYGMNEPPGAR, CVLVYGMNEPPGAR, CVLVYGMNEPPGAR, CVLVYGMNEPPGARAR, AVAESGIYPAVNPLECASR, IMPDPVIDVDHYNVAQDIVQMLTY, IMPDPVIDVDHYNVAQDIVQMLTY, MAEAAAAMEK, K, MAEAAAAMEK, MAEAAAAMEQ, MAEAAAAMEKQR, MAEAAAAMEKQR
31	ATPase beta subunit [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146088806	56485	5.14	324	21	8/57	CIAMQTTDLLK, VVSTGGNISVPVGRETLG, IFNVLGDAIDQRPVGEK, GPVGEKMR, MAIHAEPK, VIDLKGESC, AVAESGIYPAVNPLECASR, IMPDPVIDVDHYNVAQDIVQMLTK	
38	trypanothione reductase [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 104745490	51902	5.74	154	7	6/94	QLEANGIQVR, SQALQLDK, SQALQLDKAGVK, SQALQLDKAGVK, TSMDNIAIGDVTSR, TSMDNIAIGDVTSR	
41	p45 [<i>Leishmania major</i>]	gi 6274526	40723	6.61	48	2	1/19	LGDDTTITAK	
43	elongation factor 1-alpha [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146083153	49497	9.03	259	16	8/31	IGGIGTVPVGR, VETGIMKPGDVVTFAPANVTTEVK, VETGIMKPGDVVTFAPANVTTEVK, SIEMHHEQLAEAPGDVGFNVK, FAEIESK, AIKSGDAAIVK, SGDAAIVK, SGDAAIVK	
46	trypanothione reductase [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 104745490	51902	5.74	314	12	9/59	QLEANGIQVR, TKLSPK, SQALQLDK, SQALQLDKAGVK, SQALQLDKAGVK, TGKNDAVLVDAYS, TGKNDAVLVDAYS, TSMDNIAIGDVTSR, TSMDNIAIGDVTSR	
60	52 kDa PDI [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 116293933	52634	5.13	378	16	12/47	TAAGIASYMK, TAAGIASYMK, TAAGIASYMKAQVGPSMK, AQVGPSMK, AGELEDLKK, EAFPVCVVK, EAFPVCVVT, TASADSEMALMMTK, SFESENVIIAK, SHLTASAGPSDKSDEEDL, SHLTASAGPSDKSDEEDL, SHLTASAGPSDKSDEEDL	
63	52 kDa PDI [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 116293933	52634	5.13	632	25	23/74	TLAPEFIK, TAAGIASYMK, TAAGIASYMK, TAAGIASYMKAQVGPSMK, TAAGIASYMKAQVGPSMK, AQVGPSMK, AQVGPSMKTIK, EAFPVCVVK, TASADSEMALMMTK, TASADSEMALMMTK, TASADSEMALMMTK, TASADSEMALMMTK, TASADSEMALMMTK, SQVLLTYIDGDQYRPVSR, LHPAYEK, VAKSFESENVIIAK, SFESENVIIAK, SFESENVIIAK, TADDMMAFVK, TADDMMAFVK, SHLTASAGPSDKSDEEDL, SHLTASAGPSDKSDEEDL, SHLTASAGPSDKSDEEDL	
64	enolase [<i>Leishmania mexicana</i>]	gi 77176833	46616	5.60	936	52	21/	SAVPSGASTGVHEACELR, SKLGANAILGCSMAISK, LGANAILGCSMAISK, LGANAILGCSMAISK, AGVPLYR, LPVPCFNVINGGK, HAGNVLPFQEFMIAPTK, HAGNVLPFQEFMIAPTK, MGSEVYHALK,	

66	52 kDa PDI [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 11629393 3	52634	5.13	834	36	34/92	YQDAVNVGDEGGFAPPIK, FAICMDCAASEAYDAER, WVSEYPLVSIEDPFAEDNFDEFSAITK, QIVGDDTLVTNVER, QIVGDDTLVTNVER, SACNSLLLK, SACNSLLLKINQIGTISESIAAAK, INQIGTISESIAAAK, SGETEDTYIADLSVGLGTGQIK, TGAPCRGER, TAKLNQLLR, TAKLNQLLR DNFDKIVSGDLTLVK, TLAPEFIK, VKDYDGPR, VKDYDGPR, TAAGIASYMK, TAAGIASYMK, TAAGIASYMKQVGPSPMK, TAAGIASYMKQVGPSPMK, TAAGIASYMKQVGPSPMK, QVGPSPMK, QVGPSPMK, QVGPSPMKTIK, GELEDLKE, EAFPVCVVT, TASADSEMALMMTV, TASADSEMALMMTV, TASADSEMALMMTV, TASADSEMALMMTV, TASADSEMALMMTV, TASADSEMALMMTV, TASADSEMALMMTV, SQVLLTYIDGDQYRPVSQ, HHVMDAATPVTSESVAAFVEY, LHPAYEV, LHPAYEKVAS, VAKSFESENVIIAM, SFESENVIIAM, SFESENVIIAM, TADDMMAFVS, TADDMMAFVS, TADDMMAFVS, SHLTASAGPSDKSDEEDL, SHLTASAGPSDKSDEEDL, SHLTASAGPSDKSDEEDL TLAPEFIK, VKDYDGPT, TAAGIASYMK, TAAGIASYMK, TAAGIASYMKQVGPSPMT, TAAGIASYMKQVGPSPMK, TAAGIASYMKQVGPSPMK, QVGPSPMT, QVGPSPMKTIK, GELEDLKE, GELEDLKE, EAFPVCVVT, TASADSEMALMMTV, TASADSEMALMMTV, TASADSEMALMMTV, TASADSEMALMMTV, TASADSEMALMMTV, TASADSEMALMMTV, SQVLLTYIDGDQYRPVSQ, HHVMDAATPVTSESVAAFVEY, VAKSFESENVIIAM, SFESENVIIAM, SFESENVIIAM, TADDMMAFVS, TADDMMAFVS, SHLTASAGPSDKSDEEDL, SHLTASAGPSDKSDEEDL, SHLTASAGPSDKSDEEDL
67	52 kDa PDI [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 11629393 3	52634	5.13	727	31	28/75	VGGDYLAR, MGLSPNDSL, MGLSPNDSL, MGLSPNDSRLVEIS, SIACAVSNLYEDPDDACCMFTSQ, IPALGATLNMGGDDKTAVSAVLQNI GFSGDDAPR, SANEEAFELPDGNVMMVGNQF ADLVNNLGTIAR, EVTKEYEVQNK, YQSLTDPSVLGDATR, YQSLTDPSVLGDATRLCVR INVYFDESAGGR, INVYFDESAGGRYVPR, EAESCDLQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLISK, GLSVAELTQQMFDK, YLTASALFR MREIVSCQAGQCGNQIGSF, MREIVSCQAGQCGNQIGSF, EIVSCQAGQCGNQIGSF, INVYFDESAGGY, INVYFDESAGGRYVPR, VLMDLEPGTMDSVR,
71	3-ketoacyl-coa thiolase-like protein	gi 14608722 1	47820	7.60	119	15	6/42	
76	Actin	gi 1168337	42249	5.40	97	8	2/43	
85	HSP83 heat shock protein 83-1	gi 123665	81046	5.00	211	5	4/24	
86	beta tubulin	gi 129683	59302	4.69	188	16	5/28	
88	beta tubulin [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 14607807 9	50334	4.74	1227	49	40/111	

								VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, GHYTEGAELIDSVLDVCK, GHYTEGAELIDSVLDVCRE, EAESCDCLQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLISL, EAESCDCLQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLISL, IMMFSVIPSPV, FPGQLNSDLK, FPGQLNSDLK, FPGQLNSDLRL, LAVNLVPFPL, LAVNLVPFPL, GSQQYRGLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDANKMMQAADPH, NMMQAADPH, NMMQAADPH, NMMQAADPH, NMMQAADPRHGY, NMMQAADPRHGY, HGRYLTAALFG, YLTAALFG, MSTKEVDEQMLNVQNN, MSTKEVDEQMLNVQNN, MSTKEVDEQMLNVQNN, EVDEQMLNVQNN, EVDEQMLNVQNN, NSSYFIEWIPNNIS, SSICDIPPG, SSICDIPPG, SSICDIPPKGLM, SSICDIPPKGLM, SSICDIPPKGLM
89	beta tubulin	gi 13569565	50394	4.74	587	36	19/124	MREIVSCQAGQCGNQIGSF, MREIVSCQAGQCGNQIGSF, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, GPYQQLFRPDNFIGQSGAGNNWAG, GHYTEGAELIDSVLDVCK, GHYTEGAELIDSVLDVCRE, LAVNLVPFPL, GSQQYRGLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDAN, HGRYLTAALFG, YLTAALFG, EVDEQMLNVQNN, NSSYFIEWIPNNIS, SSICDIPPG, SSICDIPPKGLM, SSICDIPPKGLM
109	elongation factor 1-beta [<i>Leishmania major</i>]	gi 15787557	25630	5.15	70	6	3/69	KAWGAPVV, VAAPELM, VAAPELM
114	alpha tubulin [<i>Leishmania donovani</i>]	gi 606648	50512	4.89	262	14	6/63	CIFLDLEPTVVDEVT, CIFLDLEPTVVDEVRTGTYQ, QLFNPEQLVSGKEDAANNYAG, LSVDYGKS, RSLDIERPSYTNVNL, SLDIERPSYTNVNL
117	beta tubulin	gi 135485	50647	4.72	145	11	6/14	MREIVSCQAGQCGNQIGSF, MREIVSCQAGQCGNQIGSF, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, GHYTEGAELIDSVLDVCRE
118	beta tubulin	gi 135485	50647	4.72	207	15	7/45	MREIVSCQAGQCGNQIGSF, MREIVSCQAGQCGNQIGSF, INVYFDESAGGRYVPR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, GHYTEGAELIDSVLDVCRE
119	beta tubulin	gi 135485	50647	4.72	219	13	8/48	MREIVSCQAGQCGNQIGSF, MREIVSCQAGQCGNQIGSF, INVYFDESAGGRYVPR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, LAVNLVPFPL
125	14-3-3 protein-like protein [<i>Leishmania major</i>]chr 36	gi 15787713	29783	4.79	384	43	9/98	LAEEAERFDEMLLCIK, LNSELDTTEEN, LNSELDTTEERNLLSVAYN, VITSEIESE,

126	enolase [<i>Leishmania mexicana</i>]	gi 77176833	46616	5.60	84	6	2/49	ENAKENSATLPFVVNMR, YYAEIDSGDGQQ, QAYDEAVTELETLDDEAYHESNTIVL, LLRENLNLTWDDQL, LLRENLNLTWDDQL
147	mitochondrial trypanedoxin peroxidase [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 61619796	25556	6.90	103	7	4/34	LGANAILGCSMAISK, QIVGDDLTVTNVEV NVDEALV, GEFFEN, GEFFEKNM, GEFFEKNM
163	ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	gi 15433446 6	21690	6.74	97	8	1/17	NCPPDLETYNATLQI
164	cytochrome c oxidase subunit V [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 14608994 2	22382	6.10	132	15	6/46	TQYASTMDPD, TQYASTMDPD, TQYASTMDPRDADVLR, TQYASTMDPRDADVLR, DADVLR, SLEETMKWEATPG
167	nucleoside diphosphate kinase [<i>Trypanosoma brucei</i>]	gi 5726483	16832	9.01	79	13	3/22	TFAVVKPDGVQN, TFAVVKPDGVQN, GDFAVDVG
182	cytosolic trypanedoxin [<i>Leishmania donovani</i>]	gi 15778182 1	16680	5.23	92	11	2/51	HALTQDPEGAQFPWRDE, HALTQDPEGAQFPWRDE
189	hypothetical protein [<i>Leishmania major</i> strain Friedlin]	gi 15786616 6	13379	5.26	219	33	8/60	FGYVDYTK, NQGVVEVK, NQGVVEVKI, KICTSR, QFDDVS, RAEAGEADDE, RAEAGEADDE, RAEAGEADDE
199	ATPase beta subunit, putative	gi 14608880 6	56485	5.14	503	28	17/61	CIAMQTTDLLL, CIAMQTTDLLL, VVSTGGNISVPVGE, VVSTGGNISVPVGRETGLI, IFNVLGDAIDQG, IFNVLGDAIDQRPVGE, GPVGEKMM, MAIHAEAPL, MAIHAEAPL, MAIHAEAPL, EGTDLYLEMMQSV, VIDLKGESC, CVLVYQQMNEPPGAR, CVLVYQQMNEPPGAR, VAESGIYPAVNPLECASI, IMDPDVIDVDHYNVAQDIVQMLTY, MAEAAAAMEQ
234	heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor, putative	gi 57015345	68915	5.52	245	8	6/22	VLESEGFT, NVPYKIVR, QATKDAGTIAGLNVIV, DAGTIAGLNVIV, TSGIDLSKEM, SKFEGITQL
290	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16; mitochondrial processing peptidase, beta subunit [<i>Leishmania infantum</i>]	gi 14610080 1	55009	6.61	306	23	11/40	RPASNHATSAAFE, RPASNHATSAAFREVLIS, VACEENPLSL, LATVGVWMDAGSRYEPIAYAGTAV, MEDADIVK, MEDADIVK, MEDADIVKAR, MEDADIVKAR, CAFDSTPYGVGTPLYGTEGVKV, ATVIPESY, TFSSLDHSTPTNTHFNES
306	alpha tubulin [<i>Leishmania donovani</i>]	gi 606648	50512	4.89	252	17	5/16	CIFLDLEPTVVDEVT, CIFLDLEPTVVDEVRTGTYQ, QLFNPEQLVSGKEDAANNYAG, SLDIERPSYTNVNL, YHEQLSVADITNSVFEPAGMLTC
330	reiske iron-sulfur protein precursor [<i>Leishmania major</i> strain Friedlin]	gi 72547588	34062	5.93	258	24	9/25	VSLVFKQLEGNMPLTK, VSLVFKQLEGNMPLTK, YAKYSDPALCDVDTSDEVVLNTYPEGAPQGI, YSDPALCDVDTSDEVVLNTYPEGAPQGI, LADDMEDR, LADDMEDRAV, LADDMEDRAV, IRQGPAPLNLEVPPYW, QGPAPLNLEVPPYW
334	14-3-3 protein-like protein [<i>Leishmania infantum</i>]	gi 14610410 7	29826	4.79	138	18	3/52	QAALNAYQK, QAYDEAVTELETLDDEAYHESNTIVL, LLRENLNLTWDDQL
335	hypothetical protein [<i>Leishmania infantum</i>]	gi 14610265 2	29168	5.82	159	12	4/26	LYASDFER, IYVAPGKEQDR, TTWEDNIETEVLK, TTWEDNIETEVLRY
340	hypothetical protein [<i>Leishmania infantum</i>]	gi 14608749	27651	8.24	114	9	3/48	VLSGVSPSEGQAMEK, VLSGVSPSEGQAMEK, ETTVAALLI

343	JPCM5] mitochondrial tryparedoxin peroxidase [<i>Leishmania amazonensis</i>]	8 gi 61619796	25556	6.90	119	7	4/26	NVDEALV, GEFFEN, GEFFEKNM, GEFFEKNM
348	ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	6 gi 15433446	21690	6.74	58	8	1/23	NCPPDLETYNATLQI
352	beta-tubulin [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	2 gi 15434385	20608	4.67	300	41	11/72	MMGFAPLTSG, MMGFAPLTSG, MGFAPLTSG, MGFAPLTSG, GSQQYRGLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDAN, NMMQAADPH, HGRYLTASALFG, EVDEQMLNVQNN, VGEQFTGMFR
353	ATP synthase, epsilon chain [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	8 gi 14609421	20461	5.02	118	7	3/52	IGVLESVIQSLK, IGVLESVIQSLKHA, IGVLESVIQSLKHA
354	ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	4 gi 14608183	21617	6.74	194	26	6/74	YYDEAGEVLVNMNVN, IYEAPSQ, FCAMMDLMEEMQHN, LGYCVL, LGYCVAKLMEAEFR, LMEAEFR
355	cytochrome c oxidase subunit V [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	2 gi 14608994	22382	6.10	326	57	15/81	KPEVNDRIT, TQYASTMDPD, TQYASTMDPD, TQYASTMDPRDADVLR, TQYASTMDPRDADVLR, VFLPPLGDPHRLLC, CYSLMAYPILDDKGGQLV, CYSLMAYPILDDKGGQLV, VVIPHMELVEYLAS, SLETMKWEATPG, SLETMKWEATPG, SLETMKWEATPG, GAASLLESLYG, GAASLLESLYG, GAEIPDHVFQTPAVIEL

pI, isoelectric point; M.wt., molecular weight.

Tabela 2 - Categorias de processos biológicos das proteínas identificadas a partir de *Leishmania (L.) amazonensis* por espectrometria de massas

Categorias	número de spots identificados	Presente em Infectiva	Presente em Não Infectiva
Estrutural			
Actin	1	X	X
α - Tubulina	2	X	X
β - Tubulina	7	X	X
Proteína de enovelamento/Resposta ao stress			
HSP70	6	X	X
HSP83	1	X	
52 kDa PDI, Protein disulfide isomerase	4	X	X
Antioxidante/Desintoxicação			
Mitochondrial tryparedoxin peroxidase	2	X	X
Cytosolic tryparedoxin	1	X	X
Trypanothione reductase	2	X	X
Metabolismo de ácidos nucleicos			
ATP synthase, epsilon chain putative	1	X	X
Hidrólise de ATP			
ATPase beta subunit, putative	3	X	X
Síntese de proteínas			
Elongation factor 1-alpha	1	X	
Elongation factor 1- beta	1	X	X
Metabolismo de carboidratos			
Enolase	2	X	X
Metabolismo de purina/pirimidina			
nucleoside diphosphate kinase	1	X	
Respiração celular			
Cytochrome c oxidase subunit V	2	X	X
reiske iron-sulfur protein precursor	1	X	X
Processos biológicos desconhecidos			
3-ketoacyl-coa thiolase-like protein	1	X	
14-3-3 protein-like protein	2	X	X
ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor	3	X	X
hypothetical protein	3	X	X
metallo-peptidase, Clan ME, Family M16; mitochondrial processing peptidase, beta subunit	1		X
p45	1	X	X

Dentro do grupo de proteínas envolvidas com detoxificação e antioxidantes, consideradas importantes para sobrevivência do parasita no interior da célula hospedeira, foi confirmada a presença de cinco spots identificados como: triparedoxina mitocondrial peroxidase, triparedoxina citosólica e tripanotiona redutase. As três proteínas foram comuns em ambas as condições, no entanto os spots das proteínas triparedoxina citosólica e tripanotiona redutase foram cinco vezes mais abundantes nas promastigotas infectivas (figura 4), enquanto a triparedoxina peroxidase mitocondrial foi similarmente expressa nas duas condições (0.404/0.400).

Na categoria funcional de metabolismo de carboidratos, uma enzima glicolítica, enolase, foi identificada nas duas condições com percentual de volume similar (0.272/0.204). Essa enzima também participa no metabolismo de nucleosídeo difosfato quinase. Além de apresentar funções importantes no metabolismo celular, essa enzima previne a lise mediada por ATP dos macrófagos infectados por *L. amazonensis*, assim mantendo a integridade das células hospedeiras para o benefício do parasita [54,55].

DISCUSSÃO

Os sistemas utilizados para avaliar a infectividade *in vitro* e *in vivo* confirmaram o status das linhagens analisadas e mostraram que a manutenção de culturas *in vitro* por um longo período de tempo é capaz de causar mudanças na infectividade de *L. amazonensis*. Resultados similares foram relatados por Grimaldi et al. [56], que mostrou que amastigotas e promastigotas recém isoladas produzem mais lesões nodulares em animais e têm número maior de bandas

protéicas em géis de poliacrilamida que aquelas mantidas *in vitro* por muitas passagens. Isso sugere que mudanças adaptativas modificam o desenvolvimento.

A literatura indica que fatores específicos e não específicos da resposta imune do hospedeiro estão envolvidos no controle da progressão da doença e também que a sobrevivência do parasita depende da capacidade de promastigotas e amastigotas em evadir aos mecanismos adaptativos da resposta e estabelecer a infecção no hospedeiro vertebrado [57]. Assim, para o estabelecimento do estado infectivo, é necessário a presença de uma série de moléculas de superfície, incluindo LPG e GP63. Um dos papéis dessas moléculas é mediar a interação do parasita com receptores dos macrófagos, assim facilitando sua internalização. Para que a infecção se estabeleça, o parasita usa vários mecanismos para evadir a resposta imune do hospedeiro vertebrado, incluindo inibição da apoptose da célula do hospedeiro, observada tanto em experimento *in vitro* [58] como *in vivo*.

Além do LPG e da GP63, outra molécula de superfície do parasita, GIPL (glicosilinositolfosfolipídeos) parece ter um papel importante na ligação do parasita ao macrófago, uma vez que anticorpos contra essa molécula bloqueiam a internalização do protozoário [59]. Assim, *Leishmania* têm que sobreviver ao processo de fagocitose que envolve a invasão da célula alvo, a inibição da formação do fagolisossomo e dos radicais hidroxil e a remoção dos anions superóxido pelo LPG.

A inibição da degradação por enzimas do fagolisossomo pela GP63, a transformação em amastigotas que são mais resistentes a enzimas, óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o pH ácido do fagolisossoma [60] deve ocorrer de forma a estabelecer a infecção. Todos esses eventos dependem da expressão de várias proteínas que interagem em um complexo sistema de regulação. O resultado da infecção por *Leishmania* é determinado por ambas as

espécies: parasita, hospedeiro e sua composição genética. Embora se tenha aprendido muito sobre a resposta imune do hospedeiro contra esse parasita, o conhecimento sobre fatores derivados do parasita ainda são limitados. A conclusão recente da sequência genômica nos projetos *L. major* e *L. infantum*, bem como de outras espécies do gênero, aliado aos avanços na área da proteômica, acelerou e favoreceu a busca de novas proteínas de *Leishmania*.

A primeira comparação através da proteômica entre formas infectivas e não infectivas foi realizada por Mojtabehi et al. [61] que estudou promastigotas procíclicas e metacíclicas de *L. major*. Em trabalhos anteriores, os autores apenas comparavam formas evolutivas diferentes como promastigotas e amastigotas [16,62-66]. Nestes estudos foi observada diferença qualitativa e quantitativa na expressão protéica em estágios específicos de várias espécies de *Leishmania*. Algumas das proteínas já descritas foram identificadas como comuns de amastigotas e promastigotas (infectivas ou não infectivas) ou específicas para cada uma dessas fases [62, 67-69]. Polipeptídeos são diferencialmente expressos durante essas mudanças de forma. Proteínas relacionadas à infectividade ou virulência têm sido detectadas usando eletroforese uni ou bidimensional [56,61,70-73].

As proteínas expressas por promastigotas infectivas e não infectivas podem ser divididas em três grupos: (i) proteínas que são expressas em ambos os estágios, (ii) proteínas que são preferencialmente expressas na forma infectiva, e (iii) proteínas expressas exclusivamente no estágio não infectivo.

Nesse estudo, observamos um número significativo de proteínas relacionadas à motilidade e estrutura celular, como α e β tubulina e actina, mais abundantes nas promastigotas infectivas. Os achados de Mojtabehi et al. [61] em *L. major* mostra que esse aumento também é observado

nessa forma, que apresenta maior atividade e mobilidade, mostrando explosões características de movimento irregular quando comparadas a promastigotas procíclicas [8,74].

Os resultados mostram a diferença de expressão de proteínas de choque térmico na qual a expressão de HSP70 é maior nas promastigotas infectivas enquanto HSP83 foi expressa exclusivamente nessa fase. Em *L. donovani* foi sugerido um papel importante para HSP83 na diferenciação das amastigotas [75]. Como em outros organismos, há um nível basal de expressão de HSP83 em promastigotas de *Leishmania* a 26°C, mas sua expressão é muito mais alta em amastigotas e promastigotas submetidas a altas temperaturas [76-78].

A oscilação na expressão de HSP70 foi também demonstrada em estudos que ligam essa proteína a virulência e a resistência a antimoniais [47]. Expressão diferencial de proteínas de choque térmico em parasitas que migram entre hospedeiros vertebrados e invertebrados é de interesse, uma vez que a temperatura aumenta como parte do ciclo de vida, e a indução de um fenômeno de termotolerância são uma resposta fisiológica normal que possivelmente contribui para a virulência e a capacidade do parasita de causar infecção [79]. Em nossos estudos a presença de HSP83 apenas nos parasitas infectivos e uma maior abundância da HPS70 nesse estágio também confirma a importância dessas proteínas para a sobrevivência do protozoário durante o ciclo.

A PDI (52 kDa) encontrada nesse estudo também participa no enovelamento de proteínas e foi envolvida como um possível fator de virulência em *L. major* [80]. O envolvimento dessa molécula com a virulência e a patogenicidade em *Leishmania* foi determinado por Ben Achour et al. [80]. Estudos de expressão gênica, que identificaram um gene (LmPDI) expressando altos níveis da proteína na linhagem virulenta e que quando inibido afeta o crescimento do parasita, constituindo assim, um alvo potencial para drogas anti-*Leishmania*. Em ambas as formas de

promastigotas de *L. amazonensis*, as proteínas PDIs estavam presentes com uma ligeira diminuição da quantidade na condição não infectiva. Embora muito se saiba sobre as PDIs em eucariotos superiores, poucos dados estão disponíveis com relação às PDIs em patógenos que são importantes em infecções humanas.

Apenas dois spots selecionados para identificação estavam envolvidos com síntese protéica (EF-1 α e EF-1 β). A principal função e a mais conhecida de EF-1 α é como uma proteína de ligação-GTP envolvida na taxa de regulação e fidelidade da tradução protéica [81, 82]. Além dessa função mostrou-se que essa proteína participa da inativação de macrófagos em infecções por *L. donovani*. A interação seletiva com a tirosina fosfatase-1 do hospedeiro (SHP-1) leva a um decréscimo na indução da síntese de óxido nítrico durante a ativação do macrófago por interferon- γ [53]. Devido ao fato que essa interação leva a inativação do macrófago, EF-1 α de *Leishmania* foi indicado como candidato a fator de virulência.

Evidências que EF-1 α de *Leishmania* pode ser um determinante da virulência combinado com suas significativas diferenças estruturais e funcionais quando comparadas a proteína do hospedeiro mamífero, sugere que esta proteína pode ser um alvo atraente para uma droga anti-*Leishmania* ou para o desenvolvimento de uma vacina. Esse potencial pode ser ainda maior, dado o requerimento de EF-1 α na síntese de proteínas e outras funções celulares críticas. Dentro do complexo EF-1 α , β e γ envolvidos na síntese protéica, subunidades β e γ estão envolvidas na troca GDP-GTP. A literatura reporta que o complexo EF-1 β tem atividade tripanotona S-transferase e tripanotona peroxidase [83]. Foi também identificado como um polipeptídeo associado ao fenótipo metastático de um clone de *L. guyanensis* sendo assim um dos fatores envolvidos na disseminação do parasita [65].

A enolase, uma enzima glicolítica, envolvida em vários processos fisiológicos e patofisiológicos, mostrou abundância aumentada em promastigotas infectivas estando presente em dois dos spots selecionados. Essa enzima pode ser encontrada em procariotos e eucariotos [84-86] localizada no citoplasma, superfície celular e núcleo de várias células de mamíferos, permitindo seu envolvimento em vários pontos do metabolismo celular. Originalmente caracterizada como uma enzima envolvida no metabolismo glicolítico [54], a enolase de superfície celular age como um receptor para plasminogênio [86,87]. Com a clivagem por um ativador de plasminogênio, ele é convertido em plasmina que pode ativar collagenase e degradar fibrinas e várias proteínas da matriz extracelular. Esses eventos são cruciais na dissolução do tecido fibroso e na invasão celular pelo estroma [88]. Ao concentrar plasminogênio na superfície celular pela enolase, os parasitas estocam uma fonte imediata de enzimas proteolíticas para assistir a penetração da matriz extracelular. Muitos patógenos, células imunes e células tumorais adotam essa estratégia para invadir os tecidos, o que pode ser essencial para o estabelecimento de infecções sistêmicas por patógenos, patrulhamento de tecidos por células do sistema imune e a metástase de células tumorais. Enolases de superfície de bactérias Gram-positivas são consideradas fatores de virulência [89].

Essa glicoproteína foi encontrada em *L. mexicana*, e foi observada sua interação *in vitro* com plasminogênio [90-92]. Essa interação contribui para a virulência do parasito, o que pode ser confirmado pela observação das diferenças no padrão de imunoreatividade e tamanho da lesão quando é comparada a infecção entre camundongos selvagens e camundongos deficientes em plasminogênio [93]. A presença de enolase na superfície de muitos patógenos e células tumorais, a qual apresenta um papel importante na invasão tecidual e na metástase, pode servir como um fator de diagnóstico/prognóstico e como alvo para o tratamento de certas infecções e cânceres.

Entre as proteínas específicas da forma infectiva destaca-se também a NDK. Esta é uma enzima amplamente distribuída que catalisa a transferência de NTP fosfato (nucleosídeo trifosfato) para NDP (nucleosídeo difosfato) para manter níveis adequados de NTPs nas células [94]. Outras funções foram atribuídas a NDK em diferentes organismos, e.g, na regulação da expressão gênica em células de mamíferos [95], participação na via de salvamento de purinas em tripanosomatídeos [96] e na patogênese por bactérias [97].

Apesar da importância e interesse nas propriedades bioquímicas e no significado funcional da NDK em tripanosomatídeos patogênicos, e.g, *Trypanosoma* spp. [98, 99] e *Leishmania* spp. [100], poucos estudos foram realizados nesse campo.

Estudos recentes demonstraram que NDK tem um papel importante na infecção de macrófagos por *Leishmania*, tanto nos estágios iniciais da infecção (invasão dos macrófagos por promastigotas) quanto na fase crônica (infecção por amastigotas). Além de reduzir a atividade de óxido nítrico dos macrófagos e prevenir sua citólise diminuindo o ATP extracelular, NDK de *Leishmania* pode ser utilizado para a produção de diferentes NTPs. Esses nucleotídeos, GTP e UTP, são conhecidos como reguladores da expressão gênica em vias de sinalização e assim pode também alterar os macrófagos, tornando-os um ambiente favorável para o estabelecimento do parasitismo por *Leishmania* [55]. O interesse no estudo desses protozoários é despertado não apenas pela patologia humana que ele causa, mas também como modelos de parasitismo intracelular.

4. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados apresentados nos mapas 2-DE e a identificação das proteínas presentes nas condições estudadas foram concluídos que a infectividade e virulência das promastigotas de *L. amazonensis* podem ser relacionadas a um grupo de proteínas expressas que é específico para cada condição. Entre essas proteínas destacamos as HSP70 e HSP83, EF-1 α , enolase e NDK. Nossos estudos demonstraram que a 2-DE, com alta reprodutibilidade e resolução, é uma ferramenta poderosa para documentar perfis de expressão protéica em *L. amazonensis*. A reprodutibilidade e possibilidade de fazer comparações gel a gel encorajam estudos para identificar algumas dessas proteínas diferencialmente expressas e, em conjunto com métodos imunológicos em estudos futuros, pode levar a identificação de proteínas essenciais do parasita e auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de controle para *Leishmania*.

Agradecimentos

A Dra. Adriana Franco Paes Leme e sua equipe do Laboratório Nacional de Biociências/CNPEM/ABTLuS por suas preciosas contribuições na identificação das proteínas por espectrometria de massas. Agradecemos a Anita Lima de Souza e Isabelle Bezerra Cordeiro pela digestão de proteínas; ao Dr. Jorge Luiz López-lozano (Instituto de Medicina Tropical) pelo encorajamento durante esse estudo bem como pelo suporte financeiro, ao Dr. Paulo Nogueira (FIOCRUZ/Manaus) pelos ensaios de infecção de macrófagos *in vitro*. A Dra. Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira (FIOCRUZ/Manaus), Dr. Mario Sérgio Palma e Dra. Lucilene Delazari dos Santos (UNESP/Rio Claro) pelo apóio na padronização dos géis bidimensionais, e ao senhor

Jorge Manuel Antunes pela grande ajuda na correção da versão final em inglês do manuscrito original. Esse trabalho recebeu financiamento de PPSUS/FAPEAM (projeto n.º. 047/2006) e PROTEAM (FAPEAM/SECT-AM, projeto 901/2003; FINEP projeto 01/04/0609; 01/07/0768/00). LCR é aluna de doutorado do Programa Multidisciplinar de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM e é bolsista da FAPEAM.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in Leishmaniasis. *Lancet* 2005;366:1561-77.
- [2] Pearson RD, Wheller DA, Harrison LH, Kay HD. The immunobiology of *Leishmaniasis*. *Rev Infectol Dis* 198;35:907-27.
- [3] Davidson RN. Visceral Leishmaniasis in clinical practice. *J Infec Dis* 1999;39:112-6.
- [4] World Health Organization 2004. Disponível em: <http://www.who.int/zoonoses/diseases/Leishmaniasis/en/>. Acessado em: 10 de março de 2005.
- [5] Walters L, Irons K, Chaplin G, Tesh R. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the Neotropical Sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1993;30:699-718.
- [6] Vivenes MAL, Oviedo M, Márquez JC. Desarrollo de *Leishmania mexicana* y *Leishmania amazonensis* en *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae, Phlebotomine). *Rev Colomb Entomol* 2005;31:71-4.
- [7] Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 1984;223:1417-9.

- [8] Bates PA. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 1994;2:215-8.
- [9] Da Silva R, Sacks DL. Metacyclogenesis Is a Major Determinant of *Leishmania* Promastigote Virulence and Attenuation. *Infect Immun* 1987;55:2802-6.
- [10] Salotra P, Ralhan R, Sreenivas G. Heat stress induced modulation of protein phosphorylation in virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:309-16.
- [11] Saraiva EM, Andrade AF, Pereira ME. Cell surface carbohydrate of *Leishmania mexicana amazonensis*: Differences between infective and non-infective forms. *Eur J Cell Biol* 1986;40:219–25.
- [12] Streit JA, Recker TJ, Filho FG, Beverley SM, Wilson ME. Protective immunity against the protozoan *Leishmania chagasi* is induced by subclinical cutaneous infection with virulent but not avirulent organisms. *J Immun* 2001;166:1921–9.
- [13] Pham NK, Mouriz J, Kima PE. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. *Infect Immun* 2005;73:8322–33.
- [14] Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 2002;3:1041–7.
- [15] Soares RMA, Santos ALS, Bonaldo MC, Andrade AFB, Alviano CS, Angluster J, Goldenberg S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases cell-surface polypeptide in avirulent and virulent promastigotes. *Exp Parasitol* 2003;104:104-12.
- [16] Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero J, Smith DF. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol Bioch Parasitol* 2004;136:51–62.
- [17] Cuervo P, De Jesus JB, Junqueira J, A-Lima LM, González LJ, Betancourt L, Grimaldi JRG, Domont GB, Fernandes O, Cupolillo E. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol & Biochem Parasitol* 2007;154:6-21.
- [18] Chakrabarty RS, Mukherjee H, Lu BS, Mcgwire KP, Chang MK, Basu. Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules GP63 and LPG. *J Parasitol* 1996;82:632–5.

- [19] Medina-Acosta E, Karess RE, Russell DG. Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. *Mol Biochem Parasitol* 1993;57:31–46.
- [20] Schneider P, Rosat JP, Bouvier J, Louis J, Bordier C. *Leishmania major*: Differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol* 1992;75:196-206.
- [21] Bouvier J, Bordier C, Vogel H, Reichelt R, Etges R. Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membranebound zinc endopeptidase. *Mol Biochem Parasitol* 1989;37:235–45.
- [22] Bouvier J, Schneider P, Etges R, Bordier C. Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. *Biochemistry* 1990;29:10113–9.
- [23] Beverley, S. M.; Turco, S. J. Lipophosphoglycan LPG and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol* 1998;6:35–40.
- [24] Desjardins M, Descoteaux A. Survival strategies of *Leishmania donovani* in mammalian host macrophages. *Res Immunol* 1998;149:689–92.
- [25] Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ, Beverley S. M.. The role of phosphoglycans in *Leishmania* - sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:406–11.
- [26] Spath GF, Epstein L, Leader B, Singer SM, Avila HA, Turco SJ, Beverley SM. Lipophosphoglycan is avirulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:9258–63.
- [27] Ilg T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *EMBOJ* 2000;19:1953–62.
- [28] Ilg T, Demar M, Harbecke D. Phosphoglycan repeat deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice. *J Biol Chem* 2001;276:4988–97.
- [29] Garami A, Ilg T. The role of phosphomannose isomerase in *Leishmania mexicana* glycoconjugatesynthesis and virulence. *J Biol Chem* 2001;276:6566–75.
- [30] De T, Roy S. Infectivity and attenuation of *Leishmania donovani* promastigotes: association of galactosyl transferase with loss of parasite virulence. *J Parasitol* 1999;85:54-9.

- [31] Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. Roles of cysteine proteinase sofotrypano somes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1998;1:455–60.
- [32] Wiese M. Amitogen-activated protein MAP kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. *EMBOJ* 1998;17:2619–28.
- [33] Zhang WW, Matlashewski G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:8807–11.
- [34] Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Oliviera M, Papadopoulou B. Disruption of the trypano-thione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBOJ* 1997;16:2590–8.
- [35] Hubel A, Krobisch S, Horauf A, Clos J. *Leishmania major* HSP 100 is required hiefly in the mammalians tage of the parasite. *Mol Cell Biol* 1997;17:5987–95.
- [36] Mckean PG, Denny PW, Knuepfer E, Keen J, Smith DF. Phenotypic changes associated with deletion and over expression of as tage-regulated gene family in *Leishmania*. *Cell Microbiol* 2001;3:511–23.
- [37] Figueira LP, Zanotti M, Pinheiro FG, Franco AMR7. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;41:512-4.
- [38] Novy FGE, Macneal WJ. On the cultivation of *Trypanosome brucei*. *J Infect Dis New York* 1904;1:1-30.
- [39] Nicole GL. Culture du parasite du Bouton d’Orient. *CR Acad Sci* 1908;146:842-3.
- [40] Doyle PS, Dwyer DM. *Leishmania*: Immunochemical comparison of the secretory (extracellular) acid phosphatases from various species. *Exp Parasitol* 1993;77:435-44.
- [41] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 1976;72: 248-54.
- [42] Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988;9:255-62.

- [43] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-21.
- [44] Hanna SL, Sherman NE, Kinter MT, Goldberg JB. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiology* 2000;146:2495-508.
- [45] Gull K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Ann. Rev of Microbiol* 1999;53:629-55.
- [46] Salotra P, Chauhan D, Ralhan R, Bhatnagar R. Tumor Necrosis factor-alpha induces preferential expression of stress proteins in virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Immun Lett* 1995;44:1-5.
- [47] Brochu C, Haimeur A, Ouellette M. The heat shock protein HSP70 and Heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the Protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Stress Chaperon* 2004;9:294-303.
- [48] Rico AI, Gironès N, Fresno M, Alonso C, Requena JM. The heat shock proteins, HSP70 and HSP83, of *Leishmania infantum* are mitogens for mouse B cells. *Cell Stress Chaperon* 2002; 7:339-46.
- [49] Kimura T, Nishida A, Ohara N, Yamagishi D, Horibe T, Kikuchi M. Functional analysis of the CXXC motif using phage antibodies that cross-react with protein disulphide-isomerase family proteins. *Biochem J* 2004;82:169-76.
- [50] Kimura T, Hosoda Y, Sato Y, Kitamura Y, Ikeda T, Horibe T, Kikuchi M. Interactions among yeast protein disulfide isomerase proteins and endoplasmic reticulum chaperone proteins influence their activities. *J Biol Chem* 2005;280:31438-41.
- [51] Tian R, Li SJ, Wang DL, Zhao Z, Liu Y, He RQ. The acidic C-terminal domain stabilizes the chaperone function of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 2004;279:48830-5.
- [52] Ejiri S. Moonlighting functions of polypeptide longation factor 1: from actin bund lingtozinc-finger protein R1 - associated nuclear localization. *Biosc Biotech Biochem* 2002;66:1-21.
- [53] Nandan D, Yi T, Lopez M, Lai C, Reiner NE. *Leishmania* EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. *J Biol Chem* 2002; 277:50190-7.

- [54] Pancholi, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:902-920.
- [55] Kolli BK, Kostal J, Zaborina O, Chakrabarty AM, Chang K. *Leishmania* – released nucleoside diphosphate kinase prevents ATP – mediated cytolysis of macrophages. *Mol Biochem Parasitol* 2008;158:163-75.
- [56] Grimaldi GJR.; Moomem H, Soares MJ, Moriearty PL. Enzyme variation and difference in infectivity within a single strain of *Leishmania mexicana mexicana*. *Int J parasitol* 2002;12:185-89 .
- [57] Cunningham MJ. Genomics and proteomics: the new millennium of drug discovery and development. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000;44:291-300.
- [58] Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immun* 1994;153:2930-7.
- [59] Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 1998;28:121-34.
- [60] Reis LC, Brito MEF, Souza MA, Pereira VRA. Mecanismos imunológicos na resposta celular a humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Patol Trop* 2006;35:103-15.
- [61] Mojtahedi Z, Clos J, Kamali-Sarvestani E. *Leishmania major*: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Exp parasitol* 2008;119:422-429.
- [62] El Fakhry Y, Quellette M, Papadopoulou B. A Proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*; 2002;2:1007-17.
- [63] Bente M. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 2003;3:1811–29.
- [64] Mcnicoll F, Muller M, Cloutier S, Boilard N, Rochette A, Dube M, Papadopoulou B. Distinct 3'- untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem* 2005;280:35238-46.
- [65] Walker J, Acestor N, Gongora R. Comparative protein profiling identifies longation factor-1 beta and trypanredoxinperoxidase factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. *Mol Biochem Parasitol* 2006;145:254–64.

- [66] Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigota and amastigote life stage: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* 2007;152:35-46.
- [67] Beetham JK, Donelson JE, Dahlin RR. Surface glycoprotein PSA (GP46) expression during short and long term culture of *Leishmania chagasi*. *Mol and Biochem Parasitol* 2003;131:109-17.
- [68] Yao C, Donelson JE; Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 2003;132:1-16.
- [69] Turco SJ, Descouteaux A. The lipophosphoglycan of the *Leishmania* parasites. *Ann Rev Microbiol* 1992;85:85-94.
- [70] Forgher M, Basu R, Roychoudhury K, Theinert S, Roy S, Sundar S, Walden P. Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology. *Plos one* 2006;1:1-11.
- [71] Thiel M, Bruchhaus I. Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes. *Med Microbiol Immun* 2001;190:33-6.
- [72] González-Aseguinolaza G, Almazán F, Rodríguez Jf, Marquet A, Larraga V. Cloning of the GP63 surface protease of *Leishmania infantum* Differential post-translational modifications correlated with different infective forms. *Biochim et Biophys Acta* 1997;1361:92-102.
- [73] Katakura K, Kobayashi A. Acid Phosphatase Activity of Virulent and Avirulent Clones of *Leishmania donovani* Promastigotes. *Infect Immun* 1988;56:2856-60.
- [74] Sacks DL, Hieny S, Sher A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between nonvirulent and virulent developmental stages of *Leishmania major*. *J Immunol* 1985;135:564-9.
- [75] Wiesgigl M, Clos J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* 2001;12:3307-16.
- [76] Shapira M, Mcewen JG, Jaffe CL. Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J* 1988;7:2895-901.

- [77] Lawrence F, Robert-Gero M. Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82:4414-7.
- [78] Van Der Ploeg LH, Giannini SH, Cantor CR. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. Science 1985;21:1443-6.
- [79] Gorczynski RM.. Immunization of susceptible BALB/c mice against *Leishmania braziliensis*. II. Use of temperature-sensitive avirulent clones of parasite for vaccination purposes. Cell Immun 1985;94:11-20.
- [80] Ben Achour Y, Chenik M, Louzir H, Dellagi ANDK. Identification of a disulfide isomerase protein of *Leishmania major* as a putative virulence factor. Infect Immun 2002;;3576-85.
- [81] Ryazanov AG, Rudkin BB, Spirin AS. Regulation of protein synthesis at the elongation stage. New insights into the control of gene expression in eukaryotes. FEBS Lett 1991;285:170-5.
- [82] Condeelis J. Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton. Trends 1995;20:69-70.
- [83] Vickers TJ, Wylie SH, Fairlamb AH. *Leishmania major* elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity. J Biol Chem 2004;279:49003-9.
- [84] Pancholi V, Fischetti VA. Alpha-Enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. J Biol Chem 1998;273:14503-15.
- [85] Quinones W, Pena P, Domingo-Sananes M, Caceres A, Michels PA, Avilan L, Concepcion JL. *Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase. Exp Parasitol 2007;116:241-51.
- [86] Redlitz A, Fowler BJ, Plow EF, Miles LA. The role of an enolase - related molecule in plasminogen binding to cells. Eur J Biochem 1995;227:407-15.
- [87] Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. Biochemistry 1991;30:1682-91.
- [88] Moscato S, Pratesi F, Sabbatini A, Chimenti D, Scavuzzo M, Passatino R, Bombardieri S, Giallongo A, Migliorini P. Surface expression of a glycolytic enzyme, alpha-enolase, recognized by autoantibodies in connective tissue disorders. Eur J Immun 2000;30:3575-84.

- [89] Chhatwal GS. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends Microbiol* 2002;10:205-8.
- [90] Avilán L, Calcagno M, Figuera M, Lemus L, Puig J, Rodriguez AM. Interaction of *Leishmania mexicana* promastigotes with the plasminogen plasmin system. *Mol Biochem Parasitol* 2000;110:183-93.
- [91] Calcagno M, Avilan L, Colasante C, Berrueta L, Salmen S. Interaction of different *Leishmania mexicana* morphotypes with plasminogen. *Parasitol Res* 2002;88:972-978.
- [92] Vanegas G, Quiñones W, Carrasco-López C, Concepción JL, Albericio F, Avilán L. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res* 2007;101:1511-16.
- [93] Maldonado J, Calcagno M, Puig J, Maizo Z, Avilán L. A study of cutaneous lesions caused by *Leishmania mexicana* in plasminogen-deficient mice. *Exp Mol Pathol* 2006;80:289-94.
- [94] Lascu I, Giartosio A, Ransac S, Erent M. The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomemb* 2000;32:227-36.
- [95] Postel EH. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenerg Biomemb* 2003;35:31-40.
- [96] Landfear SM, Ullman B, Carter NS, Sanchez MA. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. *Eukaryot Cell* 2004;3:245-54.
- [97] Chakrabarty AM. Nucleoside diphosphate kinase: role in bacterial growth, virulence, cell signaling and polysaccharide synthesis. *Mol Microbiol* 1998;28:875-82.
- [98] Ulloa RM, Muschietti JP, Veron M, Torres HN, Tellez-Inon MT. Purification and characterization of a soluble nucleoside diphosphate kinase in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1995;70:119-29.
- [99] Hunger-Glaser I, Hemphill A, Shalaby T, Hanni M, Seebeck T. Nucleoside diphosphate kinase of *Trypanosoma brucei*. *Gene* 2000;257:251-7.
- [100] De Oliveira AH, Ruiz JC, Cruz AK, Greene LJ, Rosa JC, Ward RJ. Expression in *E. coli* and purification of the nucleoside diphosphate kinase b from *Leishmania major*. *Protein Exp. Purif* 2006;49:244-50.

5. DISCUSSÃO GERAL

A capacidade adquirida pelos protozoários de sobreviver em seus hospedeiros vertebrados reflete as adaptações evolutivas (níveis de infectividade) que permitem a estes microorganismos se evadirem dos processos imunes do hospedeiro ou a eles resistir utilizando diversos mecanismos que necessitam da expressão de proteínas.

O sucesso da infecção em *Leishmania* está relacionado, além de outros fatores, a: (i) sobrevivência do parasito ao processo de fagocitose que envolve a invasão em células-alvo, (ii) inibição da formação do fagolisossomo e a remoção dos radicais hidroxilas e ânions superóxidos, (iii) inibição da degradação das enzimas do fagolisossomo, (iv) transformação em amastigotas que são mais resistentes às enzimas óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e (v) ao pH ácido do fagolisossomo (REIS et al., 2006).

Os seguintes aspectos da virulência e infectividade dos parasitos de *Leishmania* estão atualmente bem definidos: (i) é variável a infectividade entre clones de uma determinada cepa de *Leishmania* (HANDMAN et al., 1983; KATAKURA; KOBAYASHI, 1988); (ii) amastigotas são geralmente mais infectivas do que formas promastigotas (CHANG et al., 1985); (iii) promastigotas ativamente móveis em fase estacionária de crescimento são mais infectivas do que formas mais longas e delgadas em fase de crescimento logarítmico (SACKS, 1989; SACKS; PERKINS, 1984); (iv) é reduzida a infectividade em promastigotas após longos períodos de cultivo *in vitro* (CHANG et al., 1985); (v) mudanças na virulência são observadas nas diferentes fases de crescimento ou após cultivo prolongado em paralelo ao desenvolvimento da bioquímica

e das mudanças antigênicas dos parasitos (SACKS et al., 1985; SACKS; DA SILVA, 1987) e (vi) durante o processo de diferenciação de promastigotas infectivos (metacíclicos) para amastigotas, ocorre um aumento na expressão de determinados genes que são importantes para a sobrevivência do parasito em um ambiente inadequado do fagolisossoma de macrófagos (CHANG et al., 1990, SACKS; DA SILVA, 1987).

Os resultados de nosso estudo corroboram com as observações de estudos que afirmam que a infectividade de promastigotas é reduzida após longos períodos em cultivo *in vitro* (CHANG et al., 1985; DA SILVA; SACKS, 1987; CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998; BERREDO-PINHO et al., 2001; PERES-SAMPAIO et al., 2008). Este achado foi comprovado, quando macrófagos foram infectadas com promastigotas submetidas a um longo período de cultivo *in vitro*. Estas promastigotas não foram capazes de infectar estas células de defesa *in vitro* como também não conseguiram infectar hospedeiros mamíferos suscetíveis. A perda da virulência de formas promastigotas continuamente cultivadas provavelmente ocorreram devido à seleção na amostra inicialmente estável e virulenta para uma população de formas promastigotas totalmente avirulentas.

A partir da análise destes aspectos estabelecidos, este estudo surgiu de uma abordagem que se propôs a identificar proteínas e peptídeos relevantes na infectividade da espécie *L. amazonensis* utilizando a tecnologia proteômica, com o isolamento das proteínas pelo uso de géis bidimensionais, associado à espectrometria de massas.

Os resultados obtidos quando se realizou a comparação dos mapas bidimensionais entre as formas infectivas e não infectivas das formas promastigotas mostraram diferenças quanto ao número e intensidade dos “spots” protéicos e confirmaram dados da literatura que afirmam

diferenças significativas em várias espécies de *Leishmania* nos estágios específicos de infectividade (CHANG et al., 1985; SACKS, 1989; SACKS; PERKINS, 1984; PERES-SAMPAIO et al., 2008).

As proteínas identificadas, neste estudo, fazem parte de processos celulares como enovelamento de proteína, resposta ao stress, antioxidação, desintoxicação, metabolismo de ácidos nucléicos, hidrólise de ATP, síntese de proteínas, metabolismo de carboidratos, metabolismo de purina/pirimidina, respiração celular e movimento celular.

Dentre as principais proteínas encontradas nas formas infectivas dos parasitos e reveladas em nosso estudo estão as HSP83, nucleosídeo difosfato quinase (NDK) e fator de alongamento alfa observadas apenas nas amostras infectivas (Capítulo 2 - Figura 2).

As HSP são proteínas chamadas de choque térmico porque foram primeiramente descobertas em células expostas a altas temperaturas (MACFARLANE et al., 1990; POLLA, 1991; RICO et al., 1998), bem como altas concentrações de íons, gases e várias substâncias tóxicas (RICO et al., 1999). Em eucariotos, as HSP podem ser encontradas tanto no citosol como em organelas do tipo mitocôndria, cloroplasto e retículo endoplasmático. (MINOWADA; WELCH, 1995; GARLAPATI et al., 1999; REQUENA et al., 2000).

Discorrendo sobre a importância destas proteínas para os parasitos, vemos que a família das HSP90 (HSP83 - HSP90) é abundante e presente em procariotos e eucariotos. Sua localização é citoplasmática e algumas vezes nuclear (SCHLATTER et al., 2002). Em eucariotos superiores e em leveduras, a HSP83 citosólica tem sido conhecida por interagir diretamente com fatores de transcrição, dependente de ligante e reguladores do ciclo celular (RUTHERFORD; ZUKER, 1994; SCHEIBEL et al., 1998; BUCHNER, 1999).

Além da função mais geral, como remodeladoras moleculares, as proteínas da família HSP90 também são estudadas há muito tempo, por serem antígenos imunodominantes reconhecidos pelo sistema imune em várias doenças infecciosas, como malária, esquistossomose, triquinelose e toxoplasmose (BONNEFOY et al., 1994; ROJAS et al., 2000). No gênero *Leishmania* a HSP83 é uma das proteínas mais abundantes, constituindo 2,8% das proteínas celulares (BRANDAU et al., 1995), sendo codificada por múltiplas cópias do gene, como no caso da proteína de *T. brucei*, com 12 genes (MOTTRAM et al., 1989) e encontrada na fração solúvel do citoplasma (SHAPIRA; PINELLI, 1989; BRANDAU et al., 1995; HUBEL; CLOS, 1996). Também é conhecido o seu papel controlador da homeostase nos estágios de diferenciação celular em *L. donovani* e *T. cruzi* (WIESGIGL; CLOS, 2001; GRAEFE et al., 2002; BENTE et al., 2003).

A HSP83 possui alto nível de conservação entre tripanosomatídeos, com 84% de identidade entre *L. amazonensis* e *T. cruzi* (SHAPIRA; PEDROZA, 1990), bem como entre outros organismos, com 64% de identidade entre humanos e leveduras e 40% entre humanos e *Escherichia coli* (HtpG) (REQUENA et al., 2000). É abundante em formas amastigotas e promastigotas quando expostas ao estresse térmico.

Neste grupo de proteínas expressas apenas em infectivas a NDK é considerada uma enzima ubíqua, que catalisa a transferência de fosfato do NTP (nucleosídeo trifosfato) para NDP (nucleosídeo difosfato) para a manutenção de níveis adequados NTPs nas células (LASCU et al., 2000). Outras funções têm sido atribuídas a NDK em diferentes organismos, por exemplo, na regulação da expressão genética em células de mamíferos (POSTEL, 2003), na participação nas vias de salvamento de purinas de protozoários tripanosomatídeos (LANDFEAR et al., 2004) e patogênese bacteriana (CHAKRABARTY, 1998). Apesar da importância e interesse quanto às

propriedades bioquímicas e o significado funcional de NDK em tripanosomatídeos patogênicos [como em, *Trypanosoma* spp. (ULLOA et al., 1995; HUNGER-GLASER et al., 2000) e *Leishmania* spp. (DE OLIVEIRA et al., 2006), pouco se têm estudado neste campo. Dados recentes demonstram que a NDK desempenha um papel na infecção por *Leishmania* sp em macrófagos nos estágios de amastigotas e promastigotas. Além de reduzir atividades microbicidas do óxido nítrico de macrófagos e impedir sua citólise diminuindo ATP extracelular, NDK de *Leishmania* intra e extracelulares podem potencialmente utilizar ATP para produzir NTPs diferentes. Estes nucleotídeos, por exemplo, GTP e UTP, são conhecidos por regular a expressão de genes em vias de sinalização e, portanto, podem ainda alterar os macrófagos, tornando-os favoráveis para estabelecer parasitismo intracelular pela *Leishmania* (KOLLI et al., 2008).

Na categoria funcional de síntese protéica duas proteínas foram identificadas EF-1 α e EF-1 β . A principal função e a mais conhecida de EF-1 α é como uma proteína ligadora de GTP envolvida na taxa de regulação e fidelidade da tradução protéica (RYAZANOV et al., 1991; CONDEELIS, 1995). Além desta função foi demonstrado que esta proteína participa na desativação de macrófagos em *L. donovani* pela interação seletiva com a tirosina fosfatase-1 (SHP-1) do hospedeiro que leva a uma diminuição na expressão da indução da síntese de óxido nítrico durante a ativação do macrófago pelo interferon γ (NANDA et al., 2002). Em virtude do fato de que essa interação conduz a desativação de macrófagos, a EF-1 α de *Leishmania* é identificada como uma candidata a fator de virulência. Evidências que EF-1 α de *Leishmania* pode ser um determinante de virulência combinada com suas significativas diferenças estruturais e funcionais, quando comparado com a proteína de hospedeiro mamífero, sugerem que ela pode ser um alvo atraente para drogas anti-*Leishmania* ou o desenvolvimento de vacinas. Esse potencial

pode ser ainda maior, dada a condição essencial para EF-1 α na síntese das proteínas e outras funções celulares críticas.

Dentre as 23 proteínas identificadas nas duas condições 18 estiveram presentes em ambas as formas promastigotas revelando uma similaridade de 78,2% (18/23). Apesar da similaridade, quanto à presença nas duas condições, a maioria das proteínas apresentou-se mais expressa na forma infectiva dos promastigotas. Dentre estas podemos destacar: HSP70, PDI, enolase, triparedoxina citosólica, tripanotiona redutase e α , β – tubulinas. A importância e sua função dentro da infectividade e virulência nos tripanosomatídeos tem sido descritas na literatura como exposto a seguir.

A HSP70 é expressa como um mecanismo de defesa celular de parasitos, possibilitando a sobrevivência destes organismos, em diferentes condições de estresse, especialmente térmico, às quais o organismo é exposto ao longo do seu ciclo de vida (TSUJI et al., 1997).

Contém dois domínios principais, o domínio ATPase N – terminal que é mais conservado (cerca de 64% entre HSP70 de eucariotos), enquanto a parte C-terminal é ocupada por domínio mais variável que liga peptídeos. Estas regiões são ligadas por sítios sensíveis a protease (KELLEY, 1998).

As proteínas pertencentes à família das HSP70 tanto auxiliam para garantir um dobramento adequado das cadeias polipeptídicas quanto desempenham uma função essencial na importação de proteínas para as mitocôndrias e para o retículo endoplasmático, ligando-se à proteína precursora, sem sua conformação nativa, durante o transporte. A liberação pela HSP70 de polipéptidos recentemente sintetizados necessita de hidrólise de ATP. Essa requisição

energética é imprescindível durante os estágios subseqüentes de importação para a mitocôndria (KELLEY, 1998).

A função da HSP70 na defesa celular parece estar baseada na capacidade de associar-se com outras proteínas, de modo que modifique o destino e a função (RICO et al., 1999).

Essas chaperoninas têm um papel crítico em processos imunes normais bem como na geração de respostas imunes específicas (GUNTHER, 1991; HAAS, 1991; KAUFMANN, 1990; PIERCE et al., 1991). Entre as parasitoses, a propriedade antigênica das HSP foi inicialmente detectada na malária e esquistossomose (BIANCO et al., 1986; NENE et al., 1986; ZHANG et al., 2001).

Dentre as várias habilidades de natureza antigênica das proteínas de choque térmico podemos citar a interação com células apresentadoras de antígenos (CAA) via receptores, estimulação das CAA a secretarem citocinas inflamatórias e mediação da maturação de células dendríticas. Estas propriedades também permitem que as HSP sejam utilizadas em uma nova geração de vacinas profiláticas e terapêuticas contra câncer e doenças infecciosas (SRIVASTAVA; AMATO, 2001). Possivelmente as propriedades imunogênicas das HSP estão restritas, em grande parte, à sua região C-terminal, onde apresentam as seqüências mais divergentes entre si (KAUFMANN, 1990; SKEIKY et al., 1995).

No gênero *Leishmania*, a HSP70, assim como a HSP83, está envolvida no processo de diferenciação celular de promastigotas para amastigotas, porém a base molecular deste processo ainda não está esclarecida (BENTE et al., 2003).

Uma segunda enzima chaperonina deste grupo mais expressa em formas infectivas é a PDI que é altamente conservada, fazendo parte da superfamília tiorredoxina, localizada

principalmente no retículo endoplasmático (RE), onde participa no enovelamento de proteínas que envolve oxidação e diversas mudanças intramoleculares do Tiol-dissulfeto (NOIVA, 1999).

Na superfície da célula hospedeira, PDI contribuiu para internalização de algumas bactérias, como *Clamídia* (CONANT; STEPHENS, 2007) e também toxinas da cólera e da difteria (RYSER et al., 1991; TSAI et al. 2001). Estudos de proteômica em macrófagos relataram que chaperoninas do retículo endoplasmático como PDI participam na formação do fagossomo durante a fagocitose, em alguns modelos de parasito, incluindo protozoários do gênero *Leishmania* (GARIN et al., 2001; GAGNON et al., 2002; KIMA; DUNN, 2005; ROY et al., 2006). Foi encontrado também na superfície de macrófagos em associação com oxidase de NADPH desempenhando papel importante na fagocitose de promastigotas em *L. chagasi* (SANTOS et al., 2009).

A enolase é uma interessante enzima ubíqua envolvidos na glicólise e gliconeogênese. Ela catalisa a conversão reversível de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato. No entanto, além do seu papel metabólico, um envolvimento de enolase em várias outras funções intra ou extracelular também tem sido relatada em diferentes organismos. Esta enzima tem a habilidade de funcionar como proteína de choque térmico, que se liga ao DNA e desempenham um importante papel na transcrição. Outras funções estão relacionadas com doenças microbianas e a auto-imunidade (PANCHOLI 2001). Concernente a estas últimas funções, enolase é uma das proteínas encontradas na superfície de várias células eucarióticas e procarióticas onde ela atua como um receptor de plasminogênio (NAKAJIMA et al., 1994; REDLITZ et al., 1995; PANCHOLI; FISCHETTI, 1998; JOLODAR et al., 2003; GE et al. 2004; RAMAJO-HERNÁNDEZ et al., 2007; KNAUST et al., 2007).

O plasminogênio uma vez ligado à superfície é ativado para produzir protease plasmina, esta última desencadeia diversos processos, tais como migração celular e ativação de metaloprotease, envolvidos em eventos fisiológicos e patológicos como a penetração de parasitos nos tecidos do hospedeiro facilitando o processo de infecção (BOYLE; LOTTENBERG, 1997; COLEMAN; BENACH, 1999; LÄHTEENMÄKI et al., 2005).

Em *L. mexicana* tem sido relatado sua interação in vitro com o plasminogênio (AVILÁN et al. 2000; CALCAGNO et al. , 2002). Essa interação contribui para a virulência do parasito como se pode constatar pelas diferenças observadas no tamanho das lesões e na imunorreatividade padrão com anticorpos anti-*Leishmania* na lesão entre os animais experimentais com deficiência de plasminogênio e do tipo selvagem (MALDONADO et al., 2006). Enolase de *L. mexicana*, além de estar localizada no citosol, está associada com membranas e está localizado na face externa da membrana plasmática (QUIÑONES et al., 2007). Ela é considerada uma das moléculas que medeia a interação com o plasminogênio exercendo a função de receptor de plasminogênio na superfície do parasito. Isso, além de outras características específicas torna essa estrutura um alvo importante no estudo imunoterápicos em *Leishmania*.

O tratamento com antimoniais pentavalentes contra a leishmaniose tem como mecanismo de ação no parasito a indução do efluxo de glutathiona (GSH) e tripanotiona e a inibição da atividade da enzima tripanotiona redutase (TryR) [WYLLIE et al., 2004]. Os tripanossomatídeos como a *Leishmania* mantêm o balanço de óxido-redução (redox) por um mecanismo singular, pois são desprovidos de glutathiona redutase que, na maioria dos outros organismos, é responsável pela manutenção de um ambiente intracelular redutor/protetor dependente de GSH. Em substituição, eles possuem um sistema antioxidante baseado em tripanotiona (duas moléculas de GSH ligadas por uma unidade de espermidina) como principal tiol reduzido (FAIRLAMB et al.,

1985; FAIRLAMB; CERAMI, 1992). Juntamente com três outras óxido-redutases, tripanotiona redutase (TryR), triparedoxina (TryX) e triparedoxina peroxidase (TryP) [NOGOCEKE et al., 1997; ARIYANAYAGAM; FAIRLAMB, 2001], a T[SH]₂ é responsável pela defesa contra oxidantes, metais pesados (MUKHOPADHYAY et al., 1996) e xenobióticos (FAIRLAMB; CERAMI, 1992). A tripanotiona é mantida em sua forma reduzida pela enzima tripanotiona redutase (TryR), de modo que a TryR exerce um papel central na proteção de *Leishmania* contra espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio (produzidos pelo hospedeiro) por meio da reciclagem de tripanotiona oxidada (DUMAS et al., 1997; TOVAR et al., 1998; ROMÃO et al., 2006). A tripanotiona, por sua vez, serve como fonte de redução para triparedoxina (ALPHEY et al., 1999). Esta proteína reduz peróxidos pela ação da triparedoxina peroxidase (ALPHEY et al., 2000). Desse modo, uma função fisiológica vital tem sido descrita para a TryR, TryX e TryP na manutenção dos níveis de um ambiente redox protetor, particularmente no interior de células do hospedeiro, sob condições altamente oxidantes geradas durante a resposta de defesa.

Uma enzima, do grupo das ectonucleotidases, relacionada com a degradação do ATP extracelular (ATPase) foi identificada em padrões semelhantes de expressão nas duas formas estudadas. Essas enzimas têm sido apontadas como fatores de virulência em diversos tripanossomatídeos. As funções fisiológicas destas proteínas ainda não foram totalmente elucidadas, mas há hipóteses que sugerem a participação delas em vários processos como: proteção contra efeitos citolíticos promovidos pelo ATP extracelular, terminação da sinalização purinérgica, envolvimento na transdução de sinal e envolvimento na adesão celular. Estudos sobre o papel destas enzimas em parasitos foram descritas em espécies como *Toxoplasma gondii* (ASAI et al., 1995), *Trichomonas foetus* (JESUS et al., 2002), *Trypanosoma cruzi* (BISSAGIO et al., 2003; FIETTO et al., 2004) e *L. tropica* (MEYER-FERNANDES et al., 1997). Os resultados

obtidos com as espécies *T. gondii* e *L. amazonensis* demonstraram a participação destas enzimas na captação de adenina para as vias de salvação de purinas, necessária para a sobrevivência do parasito.

Estudos demonstram a presença de ectonucleotidases na superfície da membrana celular de promastigotas de *L. amazonensis* incluindo ecto-ATPase, ecto-ADPase, and ecto-5-nucleotidase e descrevem as características bioquímicas das diferentes atividades enzimáticas (BERREDO-PINHO et al., 2001). Já foi detectada a presença de apirase, 5'-nucleotidase, adenosina deaminase (ADA) além do maxadilan que é um potente vasodilatador e é capaz de potencializar a infecção por *Leishmania* em flebotomíneos vetores do Novo Mundo (RIBEIRO et al., 2000; CHARLAB et al., 2000). Já em *Phlebotomus papatasi* vetor de leishmaniose no Velho Mundo, ocorre a ausência de maxadilan na saliva e presença de grandes quantidades de adenosina e 5'- nucleosidases que possuem ação vasodilatadora e inibidora de agregação plaquetária, funções essas importantes para o sucesso do repasto sanguíneo do inseto vetor (RIBEIRO et al., 1999). Portanto, é possível que a interação entre a saliva e o parasito no início do processo infeccioso possa estar favorecendo a infecção em decorrência dos efeitos moduladores da adenosina na resposta imune do hospedeiro vertebrado.

O ATP extracelular é uma molécula que exerce um papel importante na resposta imune de mamíferos (LAUNOIS et al., 1997). Após o processo de injúria são liberadas altas concentrações de ATP extracelular, agindo como “sinal de perigo” e induzindo uma resposta inflamatória caracterizada pela liberação de citocinas, tais como IFN γ , IL-12 e TNF (LA SALA et al., 2003; LANGSTON et al., 2003). Os efeitos podem variar de acordo com a concentração, o tempo de ação e o tipo de célula envolvida (DI VIRGILIO, 2007). O controle dessas ações é realizado pelas enzimas com atividade da família apirase e 5'- nucleotidase, que agem sobre o ATP e seus

produtos de degradação, reduzindo a sua concentração no meio extracelular resultando na conversão em adenosina. A adenosina através da ativação de receptores purinérgicos da família P1 induz uma resposta antiinflamatória, contrária a resposta promovida pelo ATP.

Vem sendo demonstrado que existe uma correlação entre a atividade enzimática das ectonucleosidases e a virulência *in vivo* nas promastigotas metacíclicas das espécies de *L. amazonensis*, *L. major* e *L. braziliensis* podendo ser crucial para o desenvolvimento da infecção através da modulação da resposta imune. Ficou demonstrado que as apirases de promastigotas infectivos e não infectivos de *L. amazonensis* apresentaram maior atividade enzimática quando comparadas com as duas outras espécies de *Leishmania* (MARQUES-DE-SILVA et al., 2008).

Apirases do tipo ATP difosfohidrolases de membrana de *L. amazonensis* apresenta similaridades quanto a resposta imunológica no hospedeiro quando comparada a apirases vegetais, compartilhando assim epítomos conservados. Essas apirases foram identificadas como bandas difusas de 58-63kDa (COIMBRA et al., 2007) coincidindo com as massas moleculares das ATPases encontradas em nosso estudo (Capítulo 2 – Tabela 2).

Outro dado recente demonstra o envolvimento da atividade de ectonucleotidases no estabelecimento da infecção em *L. amazonensis*. Verificou-se uma relação na infectividade dos parasitos de longas passagens *in vitro* com decréscimo da atividade dessas enzimas (SOUZA et al., 2010). A atividade das ecto-ATPases em temperaturas mais elevadas e em promastigotas virulentos de *L. amazonensis* também é maior e está relacionada com o aumento da atividade de HPS70 e HSP83 (PERES-SAMPAIO et al., 2008). Provavelmente, expressão semelhante dessas ATPases em promastigotas infectivos e não infectivos em nosso estudo, pode ser observada em nossos resultados, devido ao fato de que os parasitos necessitam de produtos da lise do ATP não

somente para a modulação do processo de infecção, como também para outros processos metabólicos essenciais a sua sobrevivência como a via de salvação de purinas. Ainda vale ressaltar que, os estudos envolvendo essas enzimas demonstram a diferença na sua atividade e não na quantidade expressa no parasito.

A partir da visão das funções fisiológicas dessas proteínas descritas, é possível entender a participação destas moléculas no metabolismo de infectividade, desde a entrada do parasito no hospedeiro, até sua manutenção na célula infectada.

Após a injúria da pele do mamífero, acontece a entrada do parasito juntamente com a saliva do inseto e substâncias como a ATPase e a NDK (enzima não expressa em amostras não infectivas, Capítulo 2 – Tabela 2*) do parasito associadas com substâncias da saliva do vetor, que interagem para ajudar no salvamento de adenosina, que tem ação anti-inflamatória, e na proteção contra a ação do ATP extracelular, que aumenta sua atividade durante a penetração do parasito.

Após a penetração do protozoário, moléculas de superfície (LPG, GP63) interagem com as células fagocíticas e PDIs de membrana de macrófagos, associados com a oxidase de NADPH, que participam na formação do fagossomo durante a fagocitose. O papel das PDIs de *Leishmania* pode estar associado com sua função no enovelamento correto de proteínas de citoplasma ou membrana que por sua vez são essenciais para a interação parasito-hospedeiro e para sobrevivência intracelular.

* Em nosso estudo fica um questionamento quanto a ausência de expressão de NDK em amostras não infectivas: Seria a NDK, associada a outros fatores, uma enzimas essencial a sobrevivência da *L. amazonensis* ? Qual seria a participação das PDIs? A ausência de expressão de EF-1 α em amostras não infectivas estaria diretamente relacionada ao diferenciação das formas promastigotas em amastigotas intracelulares e consequentemente a sua sobrevivência?

A enzima enolase de membrana plasmática do parasito participa neste metabolismo de infecção servindo como receptor de plasminogênio que ao ser ativado transforma-se em plasmina ajudando na penetração do protozoário. Após a fagocitose do promastigota pela célula de defesa, ocorre a ação de proteínas como HSP70 e HP83 do parasito, que além da função como chaperoninas, participam no processo de diferenciação celular de promastigotas para amastigotas auxiliando na sobrevivência da *Leishmania* no fagolisossomo.

Para a manutenção dos níveis de substâncias relacionadas com a diferenciação e crescimento do parasito dentro e fora da célula hospedeira são utilizadas proteínas de síntese protéica como EF-1 α e EF-1 β .

Já dentro da célula, a sobrevivência da *Leishmania* depende, entre outros fatores, da ação de proteínas que inativam a atividade das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio como as EF-1 α , EF-1 β , NDK, TryR, TryX e TryP que mantêm os níveis de um ambiente redox protetor sob condições altamente oxidantes, geradas durante a resposta de defesa.

Em vista do modo em que essas proteínas participam de todo esse metabolismo de infecção é possível entender as diferenças encontradas, nas duas condições de infectividade, em promastigotas de *L. amazonensis* durante esse estudo no qual foi detectado uma maior expressão em formas infectivas da maioria das proteínas envolvidas na infectividade destes parasitos.

A procura de fatores que diferenciam tanto as espécies de *Leishmania* como os estágios dentro de uma mesma espécie quanto a sua infectividade e virulência se faz necessária para o entendimento dos mecanismos pelos quais esses parasitos infectam e causam danos aos seus hospedeiros, possibilitando a descoberta de novas ferramentas de potencial terapêutico ou imunológico contra a leishmaniose.

6. CONCLUSÕES

- ❖ Ficou demonstrada a incapacidade das promastigotas de *L. amazonensis* de cultivo axênico de fase logarítmica mantidas por longos períodos em cultivo (+90 passagens) infectarem *in vitro* macrófagos de linhagem, bem como, serem incapazes de infectar hospedeiros mamíferos suscetíveis;
- ❖ A perda da infectividade de formas promastigotas continuamente cultivadas em meio axênico provavelmente ocorreram devido à seleção na amostra inicialmente estável e infectiva para uma população de formas promastigotas não infectivas;
- ❖ A presente análise bidimensional (2-DE) de proteínas de promastigotas de *L. amazonensis* infectivas e não infectivas indicou diferenças na expressão protéica entre as formas estudadas, revelando a ausência de expressão de algumas proteínas nas amostras não infectivas;
- ❖ A maior parte das proteínas identificadas neste estudo está envolvida em processos metabólicos relacionados à infectividade e virulência de *Leishmania* como as: de choque térmico - HSP83 e HSP70, enzimas nucleosídeos difosfato quinase, dissulfeto isomerase, enolase, tripanotiona redutase, triparedoxina peroxidase mitocondrial e ATPase, a triparedoxina citosólica e os fatores de alongamento α ;
- ❖ Nas amostras não infectivas de *L. amazonensis*, não foi observada a expressão da HSP83, proteína esta envolvida no controle da homeostase nos estágios de diferenciação celular;
- ❖ Para *L. amazonensis* observou-se uma provável correlação entre a sua capacidade de sobrevivência *in vitro* e *in vivo* e a ausência de proteínas como as HSP83, o fator de

alongamento alfa e as NDKs, assim como, na redução da expressão de diversas outras proteínas observadas na análise proteômica;

- ❖ Uma vez que parasitos de gênero *Leishmania* não possuem as vias de síntese de novo de purinas e pirimidinas, estes protozoários fazem uso das vias de salvação de purinas no processo de obtenção de nucleosídeos para sua sobrevivência. A ausência de expressão de enzimas, como a NDK nas amostras não infectivas de promastigotas de *L. amazonensis* devem estar diretamente relacionadas a multiplicação e sobrevivência destes parasitos *in vitro* e *in vivo*;
- ❖ Proteínas presentes nas formas promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram perfis de intensidade de expressão diferenciados, sendo a maioria mais expressa em formas infectivas;
- ❖ Os resultados confirmam a presença de diversas proteínas relacionadas à infectividade e virulência em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cuja expressão é de fundamental importância para a sobrevivência/multiplicação do parasito no seu hospedeiro.

7. PERSPECTIVAS

Tem-se observado na literatura que provavelmente ocorra uma diferenciação, dependente da espécie na capacidade de parasitos do gênero *Leishmania* causarem lesões em seu hospedeiro produzindo conseqüentemente as variações nos quadros clínicos das leishmanioses. Desta forma tem-se buscado quais seriam os fatores quanto a sua virulência e os mecanismos que estariam influenciando na diferenciação das espécies do gênero e na sua capacidade de causar dano aos seus hospedeiros.

O metabolismo de nucleotídeos de purina de diversas espécies de parasitos é significativamente diferente daquele encontrado no hospedeiro humano. Em células de mamíferos duas vias levam a formação de nucleotídeos de purinas. Na via de síntese de-novo a purina IMP (Inosine Monofosfato) é formada. A segunda via, acoplada a via de síntese de-novo, recicla purino-nucleotídeos a partir de produtos de degradação do RNA. Em particular, protozoários parasitas dos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Plasmodium* e dos helmintos *Schistosoma* são auxotróficos para purino-nucleotídeos, sendo ausente a totalidade da via de síntese de-novo e mantendo, uma forma modificada, mas na sua maioria conservada, da via de reciclagem de purinas. Estes organismos, portanto são totalmente dependentes nas enzimas da via de recuperação (reciclagem) durante seu ciclo de vida.

A confirmação da existência dessa via e particularmente a caracterização de uma proteína que pode ser importante para a sobrevivência do parasito e que não encontra similar em seu

hospedeiro são relevantes para compreensão da biologia do parasito e podem revelar potenciais alvos quimioterápicos.

Os resultados obtidos nos levam a pensar quanto a importância de se direcionar nossos estudos futuros para as enzimas que participam em alguns dos diferentes e exclusivos processos biológicos deste parasito, tais como os que envolvem a síntese de biomoléculas pelo parasito, seja através de metodologias proteômicas, nocauteando/silenciando genes relacionados a expressão de proteínas envolvidas na sobrevivência intracelular do parasito ou através de ensaios funcionais da atividade de enzimas alvo.

Sendo assim, este estudo preliminar nos leva as seguintes questões: Seria a NDK, associada a outros fatores, uma enzimas essencial a sobrevivência da *L amazonensis* ? Qual seria a participação das PDIs? A ausência de expressão de EF-1 α em amostras não infectivas estaria diretamente relacionada a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas intracelulares e conseqüentemente a sua sobrevivência?

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

_____. DEVEP/SVS/MS. Disponível em: Portal.saúde.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_lta.pdf. Acessado em 17 de dezembro de 2009.

ACESTOR, N. et al. Establishing two-dimensional gels for the analysis of *Leishmania* proteomes. *Proteomics*. v.2, p.877–879. 2002.

AGUIAR, G. M.; MEDEIROS, W. M. Distribuição Regional e Habitats das Espécies Flebotomíneos do Brasil. In: Elizabeth Ferreira Rangel; Ralph Lainson. (Org.). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 207-255, 2003.

ALPHEY, M.; BOND, C.; TETAUD, E.; FAIRLAMB, A.; HUNTER, W. The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into the reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J Mol Biol*, 300:903-916. 2000.

ALPHEY, M.; LEONARD, G.; GOURLEY, D.; TETAUD, E.; FAIRLAMB, A.; HUNTER, W. The high resolution crystal structure of recombinant *Crithidia fasciculata* trypanothione-1. *J Biol Chem*. 274: 25613-25622, 1999.

ANDRADE FILHO, J.D.; SOUZA, G.D.; FALCÃO, A.L. Description of a new phlebotomine species, *Evandromyia gaucha* sp. nov. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), from Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007,102(6):737-40, 2007.

ANDRADE, C.R.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E.; OTSU, K. Recombinant *Leishmania* HSP90 and HSP70 are recognized by sera from visceral *Leishmaniasis* patients but not Chagas' disease patients. *Journal Clinical Microbiology*, V. 30, p. 330-335, 1992.

ANDRADE, L. S. Leishmaniose Tegumentar Americana em área de ocupação recente na periferia de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz. FIOCRUZ. 206 p. 1998.

APPELLA, E; ARNOTT, D; SAKAGUCHI, K; WIRTH, PJ. Proteome mapping by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis in combination with mass spectrometric protein sequence analysis. *E X S*. v.88, p.1-27. 2000.

ARIAS, J. R. e FREITAS, R. A. Flebótomos da Amazônia Central do Brasil. I- Resultados obtidos das capturas feitas com iscas humana e equina (Diptera: Psychodidae). Acta amazôn., 7: 507-27, 1977.

ARIYANAYAGAM, M. R.; FAIRLAMB, A. H. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol. 115, 189-198. 2001.

ATWOOD III, JA. et al. The *Trypanosoma cruzi* Proteome. Science. v.309, p.473-476. 2005.

Barral, A.; Costa, J. M.; Bittencourt, A. L.; Barral-Netto, M.; Carvalho, E. M. Polar and subpolar Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. International Journal of Dermatology 34(7):474-9, 1995.

Bates, PA. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. Experim Parasitol, v.79, n.2, p.215-218, 1994.

BEAUSOLEIL, SA. et al. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 101, p.12130–12135. 2004.

BEETHAM, J. K; DONELSON, J.E; DAHLIN, R.R. Surface glycoprotein PSA (GP46) expression during short- and long-term culture of *Leishmania chagasi*. Mol and Bioch Parasitol. v.131,n.2,p.109-117, 2003.

BENTE, M. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. Proteomics, v.3, p.1811–1829, 2003.

BERREDO-PINHO, M.; PERES-SAMPAIO, C. E.; Chrispim, P. P. M.; Belmont- Firpo, R.; Lemos, A. P.; Martiny, A.; Vannier-Santos, M. A.; Meyer-Fernandes, J. R. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. Archives of Biochemistry Biophysics 391, 16–24. 2001.

BHAUMIK, S; BASU, R; ROY, S; DE T. Infectivity and attenuation of *Leishmania donovani* promastigotes II: Association of the loss of parasite infectivity with the terminal galactosylation of precursor acceptors present in virulent parasites by the developmentally regulated galactosyltransferase. Parasite Immunology., v.25, p.517–520. 2003.

BIANCO, A.E. A repetitive antigen of *Plasmodium falciparum* that is homologous to heat shock 70 of *Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Science U.S.A, v. 83, p. 8713-8717, 1986.

BONNEFOY, S.; ATTAL, G.; LANGSLEY, G.; TEKAIA, F.; MERCEREAUPUIJALON, O. Molecular characterization of the heat shock protein 90 gene of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular of Biochemical Parasitology*, v. 67, p. 157-170, 1994.

BOYLE, M.D.P., LOTTENBERG, R.. Plasminogen activation by invasive human pathogens. *Thromb. Haemost.* 77, 1 – 10. 1997.

BRANDAU, S.; DRESEL, A.; CLOS, J. High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. *Biochemical Journal*, v. 310, p. 225-232, 1995.

BRITTINGHAM, A., MORRISON, C.J., MCMASTER, W.R., MCGWIRE, B.S., CHANG, K.P., MOSSER, D.M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.* V.155, p. 3102–3111. 1995.

CALCAGNO, M.; AVILAN, L.; COLASANTE, C.; BERRUETA, L.; SALMEN, S. Interaction of different *Leishmania mexicana* morphotypes with plasminogen. *Parasitol Res*, 88: 972-978 p. 2002.

CASADEVALL, A; PIROFSKI, LA. Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infection and immunity*, v. 69, n.8, p. 3703–3713. 1999.

CHANDA, I; PAN, A; DUTTA, C. Proteome Composition in *Plasmodium falciparum*: Higher Usage of GC-Rich Nonsynonymous Codons in Highly Expressed Genes. *J Mol Evol.* v. 61, n.4, p.513-23. 2005.

CHANG, K.-P., D. FONG, AND R. S. Bray. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis, p. 1-30. In K.-P. Chang and R. S. Bray (ed.), *Leishmaniasis*. Elsevier, London. 1985.

CHANG, K.-P., G. CHAUDURI, AND D. Fong. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 44:499-529. 1990.

CHARLAB R, ROWTON E.D, RIBEIRO J.M. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp Parasitol.*, n.95, p. 45-53. 2000.

CHAUDHURI, G.; CHAUDHURI, M.; PAN, A.; CHANG, K-P. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*: a metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J. Biol. Chem.* 264:7483–7489. 1989.

CONANT, C. G., STEPHENS, R. S. *Chlamydia* attachment to mammalian cells requires protein disulfide isomerase. *Cell. Microbiol.* 9, 222–232, 2007.

COLEMAN, J.L.; BENACH, J. L.. Use of plasminogen activation system by microorganisms. *J. Lab. Clin. Med.* 134, 567 – 576. 1999.

CONVIT, J.; CASTELLANOS, P. L.; ULRICH, M.; CASTES, M.; RONDON, A.; PINARDI, M. E.; RODRIQUEZ, N.; BLOOM, B. R.; FORMICA, S.; VALECILLOS, L. ;ET AL. Immunotherapy of localized, intermediate, and diffuse forms of American Cutaneous Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, v. 160, n. 1, p. 104-115, 1989.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses do Brasil. . *Gazeta Med.Bahia.*, v. 75, p. 3-18, 2005.

CUERVO, P; DE JESUS, JB; JUNQUEIRA, J; A-LIMA LM; GONZÁLEZ, LJ; BETANCOURT, L;GRIMALDI JR, G; DOMONT, GB; FERNANDES, O; CUPOLILLO, E. Proteome analysis of *Leishmania* (Viannia) braziliensis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol. & Bioch. Parasitol.* V. 154, p. 6-21. 2007.

CUNNINGHAM, M. J. Genomics and proteomics: the new millennium of drug discovery and development. *J Pharmacol Toxicol Methods*, v.44, n.1, p.291-300. 2000.

CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R. M; ALVES, F. A.; Leon, L. L. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes, *Exp. Parasitol.* 89, pp. 58–62. 1998.

DE, T; ROY, S. Infectivity and attenuation of *Leishmania donovani* promastigotes: association of galactosyl transferase with loss of parasite virulence. *J of Parasitol*, v.85, n.1, p.54-59, 1999.

DEA-AYUELA, M. A.; RAMA-IÑIGUEZ, S.; BOLAS-FERNANDEZ, F. Proteomic analyse de antígenos de *Leishmania infantum* promastigotas, *Proteomics* 6, p. 4187-4194. 2006.

DIAS-LIMA, A. G. ; CASTELLÓN, E. C. ; MEDEIROS, J. F. ; SHERLOCK, I. A. Estratificação vertical da fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) numa floresta primária de terra firme da Amazônia central, Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Publica*, Rio de Janeiro, 18 (3): 823-832, 2002.

DRUMMELSMITH, J.; GIRARD, I.; TRUDEL, N.; OUELLETTE, M. Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. *J. Biol. Chem.*, 279 (32), 33273–33280. 2004.

DRUMMELSMITH, J.; BROCHU, V.; GIRARD, I.; MESSIER, N.; OUELLETTE, M. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol. Cell. Proteomics*, 2 (3), 146–155. 2003.

DUMAS, C; OUELLETTE, M; TOVAR, J; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; TAMAR, S; OLIVER, M; Papadopoulou, B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *Embo J.* 16, 2590-2598. 1997.

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

ERICSSON, C; PETHO, Z; MEHLIN, H. An on-line two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis protein database of adult *Drosophila melanogaster*. *Electrophoresis*. v.18, n.3, p.484-90.1997.

FAIRLAMB, A. H.; BLACKBURN, P; ULRICH, P; CHAIT, B. T; CERAMI, A. Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*. 227, 1485-1487. 1985.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Ann Rev Microbiol*. 46, 695-729. 1992.

FENN, JB. et al. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*. v.246, p.64-71. 1989.

FENN, JB. et al. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*. v.246, p.64-71. 1989.

FORATTINI, O. P. *Entomologia Médica*. Vol. 4, São Paulo: Edgard Blücher/Edusp. 1973.

FORATTINI, O.P., PATTOLI, D.B.G., RABELLO, E.X., FERREIRA, C.A. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 6: 255-261, 1972.

FORGBER, M; BASU, R; ROYCHOUDHURY, K; THEINERT, S; ROY, S; SUNDAR, S; WALDEN P. Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome sorology. *Plos one*. V. 1 n. 1, p. 1-11. 2006.

GARLAPATI, S.; DAHAN, E.; SHAPIRA, M. Effect of acidic pH on heat shock gene expression in *Leishmania*. *Molecular of Biochemical Parasitology*, v. 100, p. 95-101, 1999.

GAGNON, E., DUCLOS, S., RONDEAU, C., CHEVET, E., CAMERON, P. H., MORTIMER, O. S., PAIEMENT, J., BERGERON, J. M., DESJARDINS, M. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119–131., 2002.

GARIN, J., DIEZ, R., KIEFFER, S., DERMINE, J. F., DUCLOS, S., GAGNON, E., SADOUL, R., RONDEAU, C., DESJARDINS, M. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J. Cell Biol.* 152, 165–180, 2001.

Ge J, Catt MS, Gregory R.L. Streptococcus mutans alfa-enolase liga superfície MG2 mucina salivar e plasminogênio humano. *Infect Immun* 72:6748-6752. 2004.

GEIER, G. et al. Aspartyl proteases in *Caenorhabditis elegans* Isolation, identification and characterization by a combined use of affinity chromatography, two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and databank analysis. *European J of Bioch.* v. 264, n.3, p.872-879. 1999.

GEIER, G. et al. Aspartyl proteases in *Caenorhabditis elegans* Isolation, identification and characterization by a combined use of affinity chromatography, two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and databank analysis. *European J of Bioch.* v. 264, n.3, p.872-879. 1999.

GENESTRA, M; CYSNE-FINKELSTEIN, L; LEON L. Protein kinase A activity is associated with metacyclogenesis in *Leishmania amazonensis*. *Cell Biochem Funct.* v. 22, p.315–320. 2004.

GIL, L. H. S.; BASANO, S. A.; SOUZA, A. A.; SILVA, M. G. S; BARATA, I., ISHIKAWA, E. A.; CAMARGO, L. M. A. Recent observations on the sand fly (Diptera:Psychodidae) fauna of the sate of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psychodopygus davisii* as a vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98: 751-5, 2003.

GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA, G; ALMAZÁN, F. J.; RODRÍGUEZ, F; MARQUET, A; LARRAGA, V. Cloning of the gp63 surface protease of *Leishmania infantum* Differential post-translational modifications correlated with different infective forms. *Biochimica et Biophysica Acta.* V. 1361, p. 92–102. 1997.

GRAEFE, D.E.; WIESGIGL, M.; GAWORSKI, I.; MACDONALD, A.; CLOS, J. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. *Eukaryotic Cell*, v. 1, p. 936-943, 2002.

GUNTHER, E. Heat shock protein genes and the major histocompatibility complex. *Current Topics of Microbiology Immunology*, v. 167, p. 57-68, 1991.

GUPTA, S. K.; SISODIA, B. S.; SINHA, S.; HAJELA, K.; NAIK, S.; SHASANY, A. K.; DUBE, A. Proteomic approach for identification and characterization of novel immunostimulatory proteins from soluble antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. *Proteomics*, 7 (5), 816–823. 2007.

HAAS, I.G. BiP- a heat shock protein involved in immunoglobulin chain assembly. *Current Topics of Microbiology and Immunology*, v. 167, p. 71-82, 1991.

HANDMAN, E.; HOCIDNG, R. E.; MITCHELL, G. E.; SPITHILL, T. W. Isolation and characterization of infective and noninfective clones of *Leishmania tropica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 7:111-126. 1983.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v.354, n.9185, p. 191-199, 1999.

HORTA, M. F. Pore-forming proteins in pathogenic protozoan parasites. *Trends in Microbiology*, Cambridge, v.5, p.363-366. 1997.

HUBEL, A.; CLOS, J. The genomic organization of the HSP83 gene locus is conserved in three *Leishmania* species. *Exp. Parasitol.* 82:225-228. 1996.

JOLODAR, A.; FISCHER, P.; BERGMANN, S.; BUTTNER, D. W.; HAMMERSCHMIDT, S.; BRATTIG, N. W. A clonagem molecular da alfa-enolase do humano filarial parasita *Onchocerca volvulus*, que se liga plasminogênio humano. *Biochim Biophys Acta* 1627:111-120. 2003.

KAMOUN-ESSGHAIER, S. et al. Proteomic Approach for Characterization of Immunodominant Membrane-Associated 30- to 36-Kilodalton Fraction Antigens of *Leishmania infantum* Promastigotes, Reacting with Sera from Mediterranean Visceral *Leishmaniasis* Patients. *Clin and Diagnost Laborat Immunol.* v.12, n.2, p.310–320. 2005.

KARAS M; HILLENKAMP, F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Anal Chem.* v.60, p.2299-2301.1988.

KATAKURA, K., AND A. KOBAYASHI. Acid phosphatase activity of virulent and avirulent clones of *Leishmania donovani* promastigotes. *Infect. Immun.* 56:2856-2860. 1988.

KAUFMANN, S.H.E. Heat shock proteins and the immune response. *Immunology Today*, v. 11,

p. 129-136, 1990.

KELLEY, W.L. The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends in Biochemical Science*, v. 23, p. 222-227, 1998.

KIMA, P. E., DUNN, W. Exploiting calnexin expression on phagosomes to isolate *Leishmania* parasitophorous vacuoles. *Microb. Pathog.* 38, 139–145, 2005.

KNAUST, A.; WEBER, M. T.; HAMMERSCHMIDT, S.; BERGMANN, S.; FROSC, M.; KURZAI, O. Proteínas citosólicas contribuir para a superfície de recrutamento de plasminogênio de *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 189:3246-3255. 2007.

LA SALA, A., D.FERRARI, F.DI VIRGILIO, M.IDZKO, J.NORGAUER, AND G.GIROLOMONI. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J.Leukoc.Biol.* 73:339-343, 2003.

LANGSTON, H.P., K. YONG, A.T. GEWIRTZ, K.E. DOMBROWSKI, AND J. A. KAPP..Secretion of IL-12 and IFN- γ , But IL-4, by Antigen-Specific T Cells Requires Extracellular ATP. *The Journal of Immunology.* 170: 2962-2970, 2003.

LAINSON R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the neotropics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 377-387, 1997.

LAINSON, R, SHAW, J. J. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science.* v.44, p. 94-106.1992.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in the New World. In L. Collier, A Balows, M Sussan (eds), *Toplet & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10th ed. Parasitology. V. 5. p.313-349. 2005.

LAISON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. *In: Peters W, Killick-Dendrick R (eds) The leishmaniasis in biology and medicine, Biology and Epidemiology*, Academy Press, London, 1-20, 1987.

LEIFSO, K.; COHEN-FREUE, G.; DOGRA, N.; MURRAY, A.; MCMASTER, W. R. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigota and amastigote life stage: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 152, 35-46. 2007.

LEMOS, J. C.; LIMA, S. C.; COSTA, M. B.; MAGALHÃES, M. J. Leishmaniose Tegumentar Americana: Fauna flebotomínica em áreas de transmissão no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Caminhos de Geografia*, 2(3): 57-73, 2001.

MACCOSS, MJ. et al. Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.99, p.7900–7905. 2002.

MACFARLANE, J.; BLAXTER, M.L; BISHOP, R.P.; MILES, M.A.; KELLY, J.M. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *European Journal of Biochemical*, v. 190, p. 377-384, 1990.

MALDONADO, J.; CALCAGNO, M.; PUIG, J.; MAIZO, Z.; AVILÁN, L. Um estudo de lesões cutâneas causadas por *Leishmania mexicana* em camundongos com deficiência de plasminogênio. *Exp Pathol Mol* 80:289-294. 2006.

MANN, M; HENDRICKSON, R. C; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*. v. 70, p.437-473. 2001.

MARQUES-DA-SILVA, E.A. OLIVEIRA, J.C. FIGUEIREDO, A.B. JÚNIOR, D.S.L. CARNEIRO, C.M. FIETTO, J.L.R. AND AFONSO L.C.C. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes and Infection*. 850-857, 2008.

MCGWIRE, B.; CHANG, K. P. Genetic rescue of surface metalloproteinase (gp63)-deficiency in *Leishmania amazonensis* variants increases their infection of macrophages at the early phase. *Mol Biochem Parasitol* 66: 345–347. 1994.

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

MINISTERIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Editora MS, 184p. 2007.

MINOWADA, G.; WELCH W. Variation in the expression and/or phosphorylation of the human low molecular weight stress protein during in vitro cell differentiation. *J Biol Chem*; 270(13):7047-54. 1995

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

MOTTRAM, J.C.; MURPHY, W.J.; AGABIAN, N. A transcriptional analysis of the *Trypanosoma brucei* hsp83 gene cluster. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, v.37, p. 115-127, 1989.

MOTTRAM, J.C; SOUZA, A.E; HUTCHISON, J. E; CARTER, R; FRAME, M. J; COOMBS, G. H.. Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6008–6013. 1996.

MUKHOPADHYAY, R; DEY, S; XU, N; GAGE, D; LIGHTBODY, J; OULLETTE, M; ROSEN, B. P. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania tarentolae*. *Proceedings. Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 10383-10387. 1996.

MÜLLER, I.; GARCIA-SANZ, J. A.; TITUS, R.; BEHIN, R.; LOUIS, J.; Analysis of the cellular parameters of the immune responses contributing to resistance and susceptibility of mice to infection with the intracellular parasite, *Leishmania major*. *Immunol. Rev.*, v. 112, p. 95-113. 1989.

NASCIMENTO, M.; ABOURJEILY, N.; GHOSH, A.; ZHANG, W-W; MATLASHEWSKI, G. Heterologous expression of a mammalian protein tyrosine phosphatase gene in *Leishmania*: effect on differentiation. *Mol. Microbiol.* V. 50, n. 5, p 1517 – 1526. 2003.

NASCIMENTO, M; ZHANG, W. W.; GHOSH, A.; HOUSTON, D. R.; BERGHUIS, A. M.; OLIVIER, M; MATLASHEWSKI, G. Identification and Characterization of a Protein-tyrosine Phosphatase in *Leishmania*: involvement in virulence, *J Biol Chem* 281 (47), p. 36257-36268. 2006.

NENE, V.; Dunne, D.W.; Johnson, K.S.; Taylon, D.W.; Cordingley, J.S. Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat shock proteins and alpha-crystallins. *Molecular of Biochemical Parasitology*, v. 21, p. 179-186, 1986.

NOGOCEKE, E; GOMMEL, D. U.; KIESS, M; KALISZ, H. M.; FLOHE, L. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothionemediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biolog Chemist*. 378, 827-836. 1997.

NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic

reticulum. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 481–493, 1999.

NUGENT, P.G.; KARSANI, S.A.; WAIT, R; TEMPERO J; SMITH DF. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol & Bioch Parasitol* . v.136, p.51–62. 2004.

NYMAN, TA. The role of mass spectrometry in proteome studies. *Biomol Eng.* v.18, n.5, p.221-227.2001.

O'DONOVAN, C; APWEILER, R; BAIROCH, A. The human proteomics initiative. *Trends in Biotechnology.* v.19, n.5, p.178-181. 2001.

PAAPE, D.; LIPPUNER, C.; SCHMID, M.; ACKERMANN, R.; BARRIOS-LLERENA, M. E.; ZIMNY-ARNDT, U.; BRINKMANN, V.; ARNDT, B.; PLEISSNER, K. P.; JUNGBLUT, P. R.; AEBISCHER, T. Transgenic, fluorescent *Leishmania mexicana* allow direct analysis of the proteome of intracellular amastigotes. *Mol. Cell. Proteomics*, 7 (9), 1688–1701. 2008.

PANCHOLI, V.; FISCHETTI, V.A. Alpha-Enolase, a novel strong plasmin (ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem*, 273: 14503-14515. 1998.

PANCHOLI, V. Multifuncional alfa-enolase: seu papel nas doenças. *Cell Mol Life Sci.* 58:902-920. 2001.

PAYNE, WE; GARRELS, JI. Yeast Protein database (YPD): a database for the complete proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* v.25, n.1, p.57-62. 1997.

PEACOCK, C.S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse humama disease, 2007.

PERES-SAMPAIO, C. E.; Almeida-Amaral, E. E. de; Giarola, N. L.; Meyer-Fernandes, J. R. *Leishmania amazonensis*: effects of heat shock on ecto-ATPase activity, *Exp. Parasitol.* 119, pp. 135–143. 2008.

PIMENTA, P. F. P.; SARAIVA, E. M. B.; ROWTON, E; MODI, G. B.; GARRAWAY, L. A.; BEVERLEY, S. M.; TURCO, S. J.; SACKS, D. L. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9155-9159. 1994.

POLLA, B.S. Heat shock proteins in host parasite interaction. *Immunology Today*, v.12, A38 – A41, 1991.

POULIN, R.; COMBES, C. The Concept of Virulence: Interpretations and Implications *Parasitol.*

Today. V. 15 n. 12, p. 474-475. 1999.

QUIÑONES W, P PEÑA, DOMINGO SANANES-M, CÁCERES A, MICHELS PA, AVILÁN L. Concepción, JL *Leishmania mexicana* : a clonagem molecular e caracterização de enolase. *Exp Parasitol* 116:241-51. 2007.

RAMAJO HERNÁNDEZ-A, PÉREZ SÁNCHEZ-R, RAMAJO MARTÍN-V, OLEAGA A. *Schistosoma bovis* : Plasminogênio obrigatório em adultos e identificação de proteínas de ligação de plasminogênio do tegumento de vermes. *Exp Parasitol* 115:83-91. 2007.

RANGEL, E. F; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 368p., 2003.

RANGEL, E. Transmission on American cutaneous leishmaniasis in peridomestic focus in Rio de Janeiro State and other similar situation comparing with the classic epidemiology in Amazon region. Seminar. Trop. Disease, Society and environment, WHO/TDR, Technical report. 1995.

REBÊLO, J.M.M.; ARAÚJO, J.A.C.; CARVALHO, M.L.; BARROS, V.L.L.; SILVA, F.S.; OLIVEIRA, S.T. Flebótomos (Diptera:Phlebotominae) da Ilha de São Luis, Zona do Golfão Maranhense, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32: 247-253, 1999.

REDLITZ, A.; FOWLER, B. J.; PLOW, E. F.; MILES, L. A. The role of an enolase - related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur J Biochem*, 227: 407-415. 1995.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual Reviews in Immunology* 13, 151–177. 1995.

REQUENA, J.M.; SOTO, M.; DORIA, M.D.; ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v.76, p.269-281, 2000.

RIBEIRO, J. M. C.; KATZ, O.; PANNELL, L. K.; WAITUMBI, J.; WARBURG, A. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J Exp Biol* 202: p. 1551-1559. 1999.

RIBEIRO, J. M.; ROWTON, E. D.; CHARLAB, R. The salivary 5'-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagous sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem, Mol Biol.*, n. 30, p.279-285, 2000.

RICO, A.I.; ANGEL, S. O.; ALONSO, C.; REQUENA, J. M. Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. *Mol Immunol*, 36(17):1131-39. 1999.

RICO, A.I.; DEL REAL, G.; SOTO, M.; QUIJADA, L.; MARTINEZ, A. C.; ALONSO, C.; REQUENA, J.M. Characterization of the immunostimulatory properties of *Leishmania infantum* HSP70 by fusion to the *Escherichia coli* maltose-binding protein in normal and nu/nu BALB/c mice. *Infect Immun*; 66(1):347-52. 1998.

RYSER, H. J., MANDEL, R., GHANI, F. Cell surface sulfhydryls are required for the cytotoxicity of diphtheria toxin but not of ricin in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 266, 18439–18442, 1991.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. Ed. Manole, 5a. Edição, São Paulo, 1999.

ROJAS, P.A.; MARTIN, V.; NIGRO, M.; ECHEVERRIA, P.C.; GUARNERA, E.A.; PSZENNY, V.; ANGEL, S.O. Expression of cDNA encoding a *Toxoplasma gondii* protein belonging to the heat-shock 90 family and analysis of its antigenicity. *FEMS Microbiology Letters*, v.190, p. 209-213, 2000.

ROJAS, R.; VALDERRAMA, L.; VALDERRAMA, M.; VARONA, MX; OUELLETTE, M; SARAVIA, NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis.* 193, 1375-1383. 2006.

ROSENZWEIG, D.; SMITH, D.; MYLER, P. J.; OLAFSON, R. W.; ZILBERSTEIN, D. Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics*, 8 (9), 1843–1850. 2008(a).

ROSENZWEIG, D.; SMITH, D.; Opperdoes, F.; Stern, S.; Olafson, R. W.; Zilberstein, D. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J.*, 22 (2), 590–602. 2008(b).

RUTHERFORD, S.L; ZUKER, C.S. Protein folding and the regulation of signaling pathways. *Cell*, v.79, p.1129-1132, 1994.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp. Parasitol.* 69:100-103. 1989.

SACKS, D. L.; DA SILVA, R. P. The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. *J. Immunol.* 139:3099-3106. 1987.

SACKS, D. L.; HIENY, S.; SHER, A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J. Immunol.* 135:564-569. 1985.

SACKS, D. L.; Perkdns, P. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223:1417-1419. 1984.

SANCHEZ, JC. et al. The yeast SWISS-2DPAGE database. *Electrophoresis.* v.17, p. 556-565. 1996.

SCHEIBEL, T.; WEIKL, T.; BUCHNER, J. Two chaperone sites in Hsp 90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 95:1495-1499. 1998.

SCHLATTER, H.; LANGER, T; ROSMUS, S.; ONNEKEN, M.L.; Fasold, H. A novel function for the 90 kDa heat-shock protein (Hsp90): facilitating nuclear export of 60 S ribosomal subunits. *Biochem. J.* 15:675-684. 2002.

SHAPIRA, M.; PINELLI, E. Heat-shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis* is an abundant cytoplasmic protein with a tandemly repeated genomic arrangement. *European Journal of Biochemical*, v. 6, p.231-236, 1989.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; BRITO, A.C.; OLIVEIRA, M.R.F.; PAES, M.G.; SOUZA, A.A.A.; SILVA, B.M.; *Leishmaniose Tegumentar Americana*. In: Leão RNQ. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*, 1997.

SILVERMAN, J. M.; CHAN, S. K.; ROBINSON, D. P.; DWYER, D. M.; NANDAN, D.; FOSTER, L. J.; REINER, N. E. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol.*, 9 (2), R35. 2008.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Annual Review of Microbiology* 41, 363–382, 1987.

SKEIKY, A. W.; GUDERIAN, J. A.; BENSON, D. R.; BACELAR, O.; CARVALHO, E. M., KUBIN, M.; BADARÓ, R.; TRINCHIERI, G.; REED, S. G. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulatory human peripheral blood mononuclear cells to Express a Th-1 type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med*; 181: 1527-37. 1995.

SOARES, RMA; SANTOS, ALS; BONALDO, MC; ANDRADE, AFB; ALVIANO, CS; ANGLUSTER, J; GOLDENBERG, S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: diferencial expression of proteinases cell-surface polypeptide in avirulent and virulent promastigotes. *Exp. Parasitol.* v. 104, p104-112. 2003.

SRIVASTAVA PK, AMATO, RJ. Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. *Vaccine*; 19(17-19):2590-7. 2001.

TSAI, B., RODIGHIERO, C., LENCER, W. I., RAPOPORT, T. A. Proteindisulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* 104, 937–948. 2001.

THEODOS, C. M.; RIBEIRO, J. M. C.; TITUS, R. G. Analyses of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmaniasis* infection in mice. *Infect Immun* 59: 1592-1598. 1991.

THIEL, M; BRUCHHAUS, I. Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes. *Med Microbiol Immunol*, v.190, n.1-2, p. 33-36, 2001.

TOVAR, J; WILKINSON, S; MOTTRAM, JC; FAIRLAMB, AH. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA locus. *Mol Microbiol*. 29, 653-660. 1998.

TSUJI, N.; OHTAS, M.; FUJISAKI, K. Expression of a 70-kDa heat-shock-related protein during transformation from free-living infective larvae to the parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitology Research*, v.83, p.99-102, 1997.

VASANTHAKRISHNA, M.; ASHWINI, S. K.; Lashitew, G. Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. *BMC Molecular Biology*, 6:3. 2005.

VÍVENES, MAL; OVIEDO, M; MÁRQUEZ JC. Desarrollo de *Leishmania mexicana* y *Leishmania amazonensis* en *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae, Phlebotomine). *Rev Colomb de Entomol*, v.31, n.1, p. 71-74, 2005.

WALKER, J.; ACESTOR, N.; GONGORA, R. Comparative protein profiling identifies longation factor-1 beta and trypanothione reductase factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 145: 254–64. 2006.

WALTERS, L.; IRONS, K.; CHAPLIN, G.; TESH, R. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the Neotropical Sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. of Med Entomol*, v.30, p.699-718, 1993.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. The heat shock protein 90 of *Leishmania donovani*. *Medical Microbiology Immunology*, v.190, p.27-31, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/zoonoses/diseases/Leishmaniasis/en/>>. Acessado em: 10 de março/2005. 2004.

WYLLIE, S; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. J Biol Chem. 279, 39925-39932. 2004.

YAN, JX. et al. The Dictyostelium discoideum proteome the SWISS-2DPAGE database of the multicellular aggregate (slug). Electrophoresis, v.18, p.491-497. 1997.

YAN, JX. et al. The Dictyostelium discoideum proteome the SWISS-2DPAGE database of the multicellular aggregate (slug). Electrophoresis, v.18, p.491-497. 1997.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Florida, Memoirs of the American Entomological Institute 54, Associated Publishers, 881p., 1994.

ZHANG, M.; HISAEDA, H.; KANO, S.; MATSUMOTO, Y.; HAO, Y. P.; LOOCARESUNAN, S.; AIKAWA, M.; HIMENO, K.. Antibodies specific for heat shock proteins in human and murine malaria. Microbes Infect; 3(5):363-67. 2001.

9. ANEXOS

Differential protein expression in infective and non-infective promastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Liliane Coelho da Rocha^{a,*}, Flavia Regina Almeida Campos^b, Alana Cristina Vinhote-Silva^a,
Luanda de Paula Figueira^a, Antonia Maria Ramos Franco^a

^aLaboratory of Leishmaniasis and Chagas Disease, National Research Institute of Amazonas - INPA, 69060-001, Manaus, Amazonas, Brazil

^bBiochemistry Laboratory - Federal University of Amazonas – UFAM, Manaus, Amazonas, Brazil

The running head: Infective and non-infective promastigote of *Leishmania amazonensis* proteomics

Abbreviations: 2-DE, Two-dimensional gel electrophoresis.

***Corresponding authors.** Laboratory of *Leishmaniasis* and Chagas Disease. INPA. Av. André Araújo, no. 2936 – Aleixo, CP. 478, CEP. 69060-001, Manaus-Amazonas, Brazil. Tel: +55 92 3643 3065. Fax: +55 92 3643 3061. E-mail addresses: lilianecr76@gmail.com (L. Rocha) and afranco@inpa.gov.br (A. Franco)

ABSTRACT

The outcome of *Leishmania* infections is determined by species, host, parasite and their genetic make-up. Although much has been learned about the immune response to this parasite, there is still a lack of knowledge concerning the factors deriving from the parasite itself. The recent completion of genome sequences for *L. major* projects and *L. infantum*, as well as other species of the genus, in accord with the simultaneous advance of proteomics, has greatly accelerated and favored the pursuit of new *Leishmania* proteins. Using a proteomic approach based on studies addressing related *Leishmania* protein infectivity, 2-DE proteomics maps to determine protein expression profiles of promastigotes infected and uninfected forms of *L. amazonensis* were developed in this study. About 251 and 145 different protein spots were detected in infective and non-infective forms, respectively. While the vast majority of spots had similar distribution and intensity, few were defined as computationally and preferentially expressed in non-infective *Leishmania* as compared with the infective kind. This data confirms the feasibility of creating an array of protein-based 2-DE protein profiles related to the infectivity/virulence of *Leishmania* species by providing a framework for the future design of studies about the virulence factors in the proteome of *Leishmania*.

Keywords: *Leishmania*; *Leishmaniasis*; Proteomic analysis; Infectivity; Two-dimensional gel electrophoresis; mass spectrometry.

1. INTRODUCTION

Leishmania is an obligate intracellular kinetoplastid protozoan that causes different clinical *Leishmaniasis*, and affects millions of people worldwide [1]. The *Leishmaniasis* is among the six World Health Organization prior disease control program, it is endemic in 88 countries with approximately 12 million infected and 350 million people at risk (<http://www.who.int/en/>). Depending on the *Leishmania* species and the host's immune response, three basic clinical manifestations of the disease can be found: Cutaneous, mucocutaneous and visceral [2, 3]. The American Cutaneous *Leishmaniasis* (ACL) is widely distributed throughout the American continent, yet the prevalence is not well defined due to factors such as data underreporting [4]. During their life cycle, the parasites alternate between two main stages: promastigotes in the gut of the sand fly insect vector and amastigotes inside the mammalian host macrophages. The promastigotes, during their migration through the insect vector's digestive tract, undergo a series of morphological and molecular modifications (nectomonad, haptomonad and paramastigote), culminating in their transformation from the procyclic (non-infective) to the non-dividing metacyclic promastigote, an infective form residing in the mouthparts of the insect vector, which is conveyed the vertebrate host [5,6]. This process, known as metacyclogenesis, can be mimicked *in vitro*. Accordingly, it was observed that promastigotes in stationary phase are in differentiated metacyclic forms [7, 8]. The promastigote forms can be easily obtained in axenic cultures. It has been ascertained that the infective *Leishmania* promastigotes, maintained for extended periods without cyclical passage *in vivo*, tend to lose their infective properties [9-12]. The infection cycle in the vertebrate host is initiated when *Leishmania* metacyclic promastigotes are transmitted by the bite of the insect vector. In the mammalian host, promastigotes are phagocytized by macrophages and internalized in the phagolysosome where the parasite is exposed to enzymes, antimicrobial peptides and reactive oxygen intermediates (ROI) generated by the activation of NADPH oxidase [13, 14]. Interestingly, despite the confrontation with this extremely hostile environment, some parasites are capable of overcoming these conditions and are converted into intracellular amastigotes, resulting in infection progression. There are several mechanisms involved in this process. The metacyclic promastigotes interacts with host defense by immunological and biochemical reactions that culminate in death or survival of the parasite. In this interaction, some proteins can be expressed on the surface of the protozoan determining the infectivity of these metacyclic forms. Due to the importance of these molecules in the parasite interaction with the host, several attempts have been made to better understand its participation in this interaction as well as the characterization and function of these molecules [15-17]. In recent decades, several molecules that play a role in the parasite biology and its infectivity have been identified. Two major surface molecules, lipophosphoglycan (LPG) and the zinc-metalloproteinase GP63 [18], are the most studied. The highly abundant *Leishmania* GP63 (surface glycoprotein), expressed in both morphological *Leishmania* stages shows to be mostly anchored to the plasma membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor [19, 20]. It has been shown to be active on a wide range of protein substrates [21, 22]. Due to its abundance and the location of *Leishmania* glycoconjugates, particularly LPG, it was an important virulence factor in *L. major* and *L. donovani* [23-26] however, LPG does not affect the virulence of *L. mexicana* demonstrated by studies with mutants in LPG2/enzyme in the biosynthesis of LPG [27, 28]. Other molecules involved in the biosynthesis of LPG, i.e, phosphomannose isomerase in *L. mexicana* [29], LPG1 in *L. major* [26] and galactosyltransferase in *L. donovani* [30] were also associated with virulence. Other factors have been described. These include the family of

cysteine proteinases [31], mitogen-activated protein kinase [32], A2 gene [33], trypanothione reductase [34], heat shock protein 100 [35] and proteins encoded by cDNA16 *L. mexicana* [36]. The characterization of these molecules has important implications for the design of new therapeutics or vaccines against parasites of the genus *Leishmania*. The present study reports the differential expression of proteins in infective and non-infective promastigotes forms of *L. amazonensis* using a proteomic analysis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1- Parasites and *in vitro* culture

The samples of *L. amazonensis* (IFLA/PA/67/PH8) were obtained from two sources. The infective form was isolated from tissue lesions of infected animals and the non-infective obtained following cultivation of 10-day axenic subcultures and with more than 90 passages *in vitro*. So as to confirm the infectivity of the samples, the follow up of the strains was carried out in two biological systems: *in vivo* by inoculation into laboratory animals susceptible to infection (hamsters/*Mesocricetus auratus*) and *in vitro* cell systems (murine macrophage cell line J774). The strain was characterized as *L. amazonensis* through isoenzymatic analysis according to the protocol described by Figueira *et al.* [37]. The promastigotes were isolated, amplified and maintained in axenic medium culture at 25°C pH 7.4 in RPMI 1640 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum [iFBS] (Gemini Bio-Products) and 50µg/mL gentamicin (Neo Chemical). Growth curve was initiated by inoculation of 3×10^6 parasites/mL in 5mL of RPMI 1640-10% iFBS. The promastigotes were harvested in late-logarithmic phase of cultivation (the fifth day of culture), washed with sterile Milli Q water and centrifuged at 3100g for 10 min. Parasite density was estimated by counting the cells in a hemocytometer.

2.2- *In vivo* assays

Promastigotes were inoculated (10^6 /0.1mL) in the right hind leg of ten hamsters that were observed weekly for the appearance of skin lesions. After a year of follow-up, biopsies were performed at the animal inoculation sites to confirm the absence of parasitism, by re-isolation in biphasic culture medium NNN [38, 39] and slides stained with Giemsa.

2.3- *In vitro* assays

J774 lineage murine macrophages maintained at 37°C with 5% CO₂ in RPMI-1640 medium supplemented with 10% iFBS [40], were used for *in vitro* assays. Culture media renewal was performed every two days by washing the cells with serum free medium, adding complete RPMI medium. The cultured macrophages were centrifuged and quantified in a hemocytometer and cell number adjusted to 10^6 /mL. In six well plates (Nuclon), each well containing a 24x24mm cover slip, 10^6 cells were added in complete RPMI in a final volume of 2mL. They were then incubated for 24 hours at 37°C for complete adhesion of macrophages to the cover slip. After incubation, cells were infected by adding medium with infective or non-infective promastigotes of *L. amazonensis*, 5×10^6 infective promastigotes (iLa) or 1×10^8 and 5×10^6 non-infective (niLa) were added to each test well containing macrophages. The medium containing the parasites was kept in contact with macrophages for 4 hours. After that time, the supernatant containing the parasites was removed from every well, renovating the RPMI medium. After 24h, supernatants were

transferred to NNN medium and coverslips stained by Panoptic Kit (Laborclin). The number of infected macrophages and amastigotes internalized were counted for analysis of infectivity.

2.4- Protein extraction

The protein extracts were obtained simultaneously for each sample pair (infective/non-infective). Promastigote forms (10^9 cells) were obtained in the complete RPMI medium and washed three times in Milli Q water by centrifugation, re-suspended in Lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 4 mM Tris HCl pH8,0 and 2% protease inhibitor mix) and centrifuged at 21,000g for 2 minutes at 4°C. The supernatant (protein extract) was kept at -80°C until use. Protein concentration was determined by the modified Bradford method [41].

2.5- Electrophoresis

For preliminary analysis of protein extracts, unidimensional polyacrylamide gels 15% were prepared. The samples were solubilized in sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue and 5% β -mercaptoethanol) and boiled at 100°C for 5 min. The run was held at 200 V at room temperature (RT) and the gels stained by Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 [42].

Isoelectric focusing for the 2-DE was performed using IPGphor apparatus (Ettan IPGPhor 3/GE Healthcare). Aliquots of 60 μ L (4×10^8 promastigotes) of protein were diluted to a final volume of 250 μ L in a rehydration solution (DeStreak™ rehydratation solution/GE Healthcare) with 2% IPG buffer pH 4-7. Samples were then applied to the immobilized pH gradient (IPG) strips (13-cm pH 4-7 linear; GE Healthcare) for in gel- rehydration. Passive rehydration was performed at 50 μ A for 12 h at 20°C, followed by an active rehydration at Isoelectric focusing (voltage step and hold mode, 50 μ A/IPG strip, 0.5% IPG buffer, 20°C, according to the manufacturer's instructions). Focused strips were stored at -80°C for a maximum of 1 week before use, or applied directly to the second dimension gel. After the IEF, each strip was equilibrated for 20 min in 5mL of equilibration solution (50 mM Tris-HCl buffer pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 0.002% BPB) added with 125 mM DTT, followed by a second incubation step in the same equilibration buffer solution with 125 mM of iodacetamide. After strips equilibration, the separation in the second dimension (according to their molecular mass) was performed by denaturing electrophoresis in 12.5% polyacrylamide gel, and run on a Hoefer™ SE 600 Ruby™ (GE Healthcare) connected to a Electrophoresis Power Supply/EPS601 (GE Healthcare). Electrophoresis was performed in Tris/Glycine/SDS buffer according to the conditions reported by O'Farrel [43]. Gels were run at 40mA/gel at 15°C until the dye front reached the bottom of the gel. After electrophoresis, gels were stained with colloidal CBB G-250 following procedures described elsewhere [42].

2.6- 2DE Image analysis

Two-dimensional gel images were digitized from stained gels using an apparatus ImageScanner™ III (GE Healthcare). The generated images were analyzed using the program ImageMaster™ 2D Platinum v6.0 (GE Healthcare). Consensus gels were created from three gel replicates per condition. The spots showing at least a double volume difference were considered as differentially expressed. The analysis of spots expression was processed using percentual parameters of volume by program ImageMaster™ 2D Platinum v6.0. The authenticity and outline of each spot were validated by visual inspection and edited when necessary. The intensity of each protein spot was normalized relative to the total abundance of all valid spots. After

normalization and background subtraction, a matched set was created for each condition (three replicates of each sample). The differential analysis was performed by comparing the quantity of spots in each condition (infective versus non-infective sample).

2.7- Protein digestion and mass spectrometry ESI-QToF (Electrospray Ionization)

Spots with differential expression were selected. These spots were excised, reduced, alkylated and submitted to in-gel digestions with trypsin [44]. An aliquot (4.5 μ L) of the resulting peptide mixture was separated by C18 resin (75 μ m x 100 mm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters) coupled with a Q-ToF Ultima mass spectrometer (Waters) with nano-electrospray source at a flow rate of 0.6 mL/min. The gradient was 2-90% acetonitrile in 0.1% formic acid over 20 min. The instrument was operated in the 'top three' mode, in which one MS spectrum is acquired followed by MS/MS of the top three most-intense peaks detected. The resulting spectra were processed using Mascot Distiller 2.2.1.0, 2008, Matrix Science (MassLynx V4.1) and searched against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) protein database using the Mascot software, with the carbamidomethylation as fixed modification, oxidation of methionine and one trypsin missed cleavage and a tolerance of 0.1 Da for both precursor and fragment ions.

3. RESULTS

3.1- *In vivo* assays

The results of experimental infection *in vivo* and *in vitro* (macrophage infectivity and SDS-PAGE gels) confirmed the differences between infective and non-infective promastigotes. In *in vivo* assays, the lesion appearance at the site of inoculation in experimental animals was observed three weeks after the inoculation of the infective sample, thus confirming its ability to infect a susceptible host. Animals inoculated with niLa were followed up for over one year and none of them developed local skin lesions and no parasites were isolated from the inoculation sites. In the group that used 5×10^6 iLa promastigotes, about 15.2% were infected, with the presence of 1.6 amastigotes per macrophages in the cells inoculated with 5×10^6 promastigotes. In macrophages incubated with 5×10^6 niLa forms, no cell was infected 24 h after incubation (Figure 1).

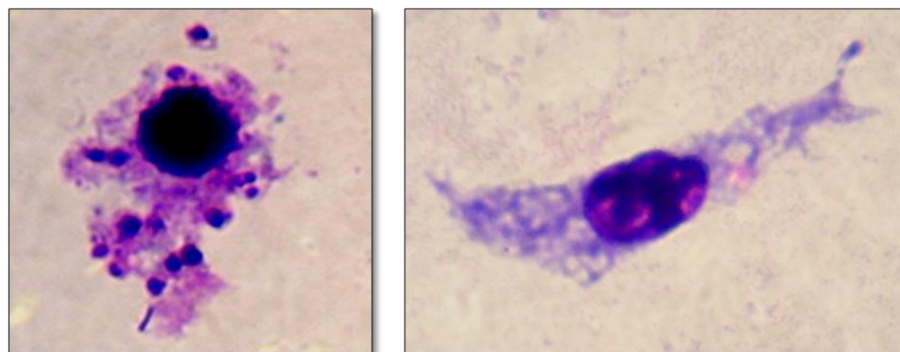


Figure 1 - *In vitro* infection avaluation of murine macrophages cell line (strain J774) 24h after incubation with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infective (Llai) and non-infective (Lla ni). The left image shows several amastigotes inside the macrophage while the image on the right illustrates the absence of amastigotes (Lla ni) in phagocytic cells.

3.2- Protein analysis

The two-dimensional maps obtained from iLa and niLa, showed marked expression of acids spots with Mr above 20kDa in both promastigotes forms (Figure 2). Visually the protein profiles in IPGs 4-7 show to be fairly similar with different intensities at various spots.

The one dimensional profile shows different expression levels of protein (volume and mass) in infective and non-infective promastigotes forms. A larger quantity of different molecular mass bands - above 30 kDa, were detected in the infective promastigotas confirmed by the bidimensional analysis (Figure 3). In the protein profile of infective form a total of 251 spots were revealed, compared to 145 spots of a non-infective one. The similarity between the gels of both conditions was 52.5%, 104 similar spots being detected. Comparative analysis of the images revealed 147 spots with specific expression in infective and 41 spots in non-infective form. Around 22 and 19 distinct protein spots were detected in iLa and niLa promastigote forms, respectively. While the vast majority of the spot distribution was similar in intensity, few were computationally and preferentially defined expressed in non-infective promastigotes as compared with the infective kind. This data confirms the feasibility of creating an array of protein-based 2-DE protein profiles related to the infectivity/virulence of *Leishmania* species by providing a framework for the future design of studies about the virulence factors in the *Leishmania* proteome.

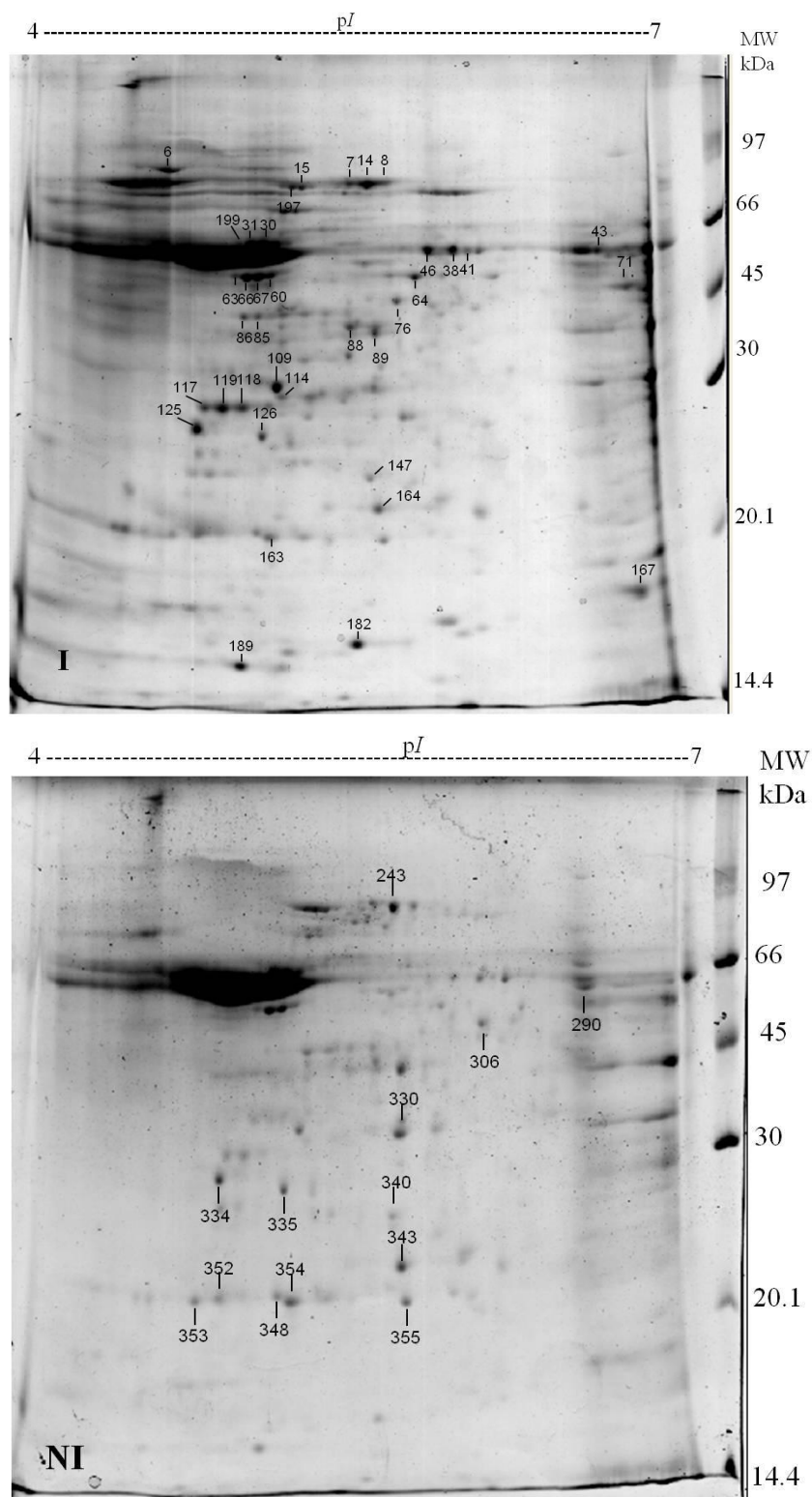


Figure 2- Comparative analysis of protein profile (total extract, 10^9 parasites) obtained after separation by 2-DE (1st dimension: IEF pH range 4-7 linear gradient and 2nd dimension: 15 % SDS-PAGE) of infective (I) and non-infective (NI) promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Proteins were extracted in lysis buffer 7M urea/2M thiourea analyzed by IEF at pH 7.4 and stained by colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250. Protein spots identified by ESI-QToF mass spectrometry are numbered and their identities are given in Table 1.

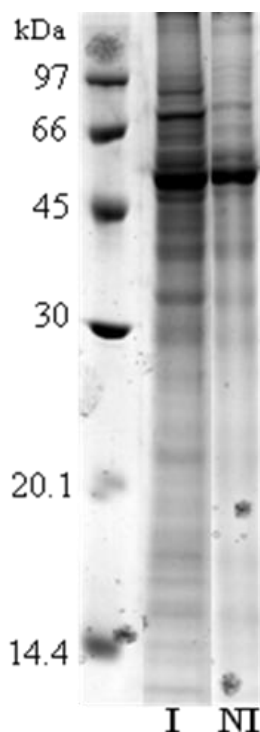


Figure 3 – One-dimensional profile of the infective (I) and non-infective (NI) promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* separated by 15% SDS-PAGE and Colloidal Coomassie Blue stained. The gel reveals a great amount of high molecular mass mainly in the infective form.

Out of the total number of spots resolved by protein-dimensional gels, 67 were separated and digested for identification by mass spectrometry. The analysis by ESI-Q ToF of 67 spots from iLa and niLa promastigotes (Table 1) resulted in the identification of 23 proteins (73% of spots) of nine functional categories. Their role was obtained from the literature where it was found that some proteins perform multiple functions (Table 2). Proteins with known role related to cell motility were found in abundance in infective promastigotes [45]. These include tubulin and actin representing 19 of the total spots identified. Another group, well represented in this study, was of HSP70, which is responsible for the folding of proteins. These proteins are implicated as potential *L. donovani* virulence factors [46] and have an important role during the genesis of the phenotype of antimony resistance in parasites of the genus *Leishmania* [47]. A total of six spots identified as HSP70 were found in both conditions and represent the second highest number (12.2%) of spots (Figure 4) following by α and β tubulin (18.3%). Another heat shock protein known as HSP83 was present in the infective specific stage (Figure 5). This protein is also involved in the protein folding and may have an important role, during the parasite infection in its mammalian host, by diverting the immune responses, in the nonspecific activation of immune cells, leading to immunosuppression or even triggering the onset of an immune response against invading pathogen [48].

Four protein spots were identified as protein disulfide isomerases (PDI) being present in both stages and visually abundant with a slight decrease in the non-infective forms (Figure 5). They

also participate in the folding of proteins such as enzymes thiol-oxidoreductases that catalyze the thiol-disulfide exchange. They ensure the proper folding and conformation of proteins, acting as co-receptors of cellular reorganization, cell toxicity and protein misfolding [49-51].

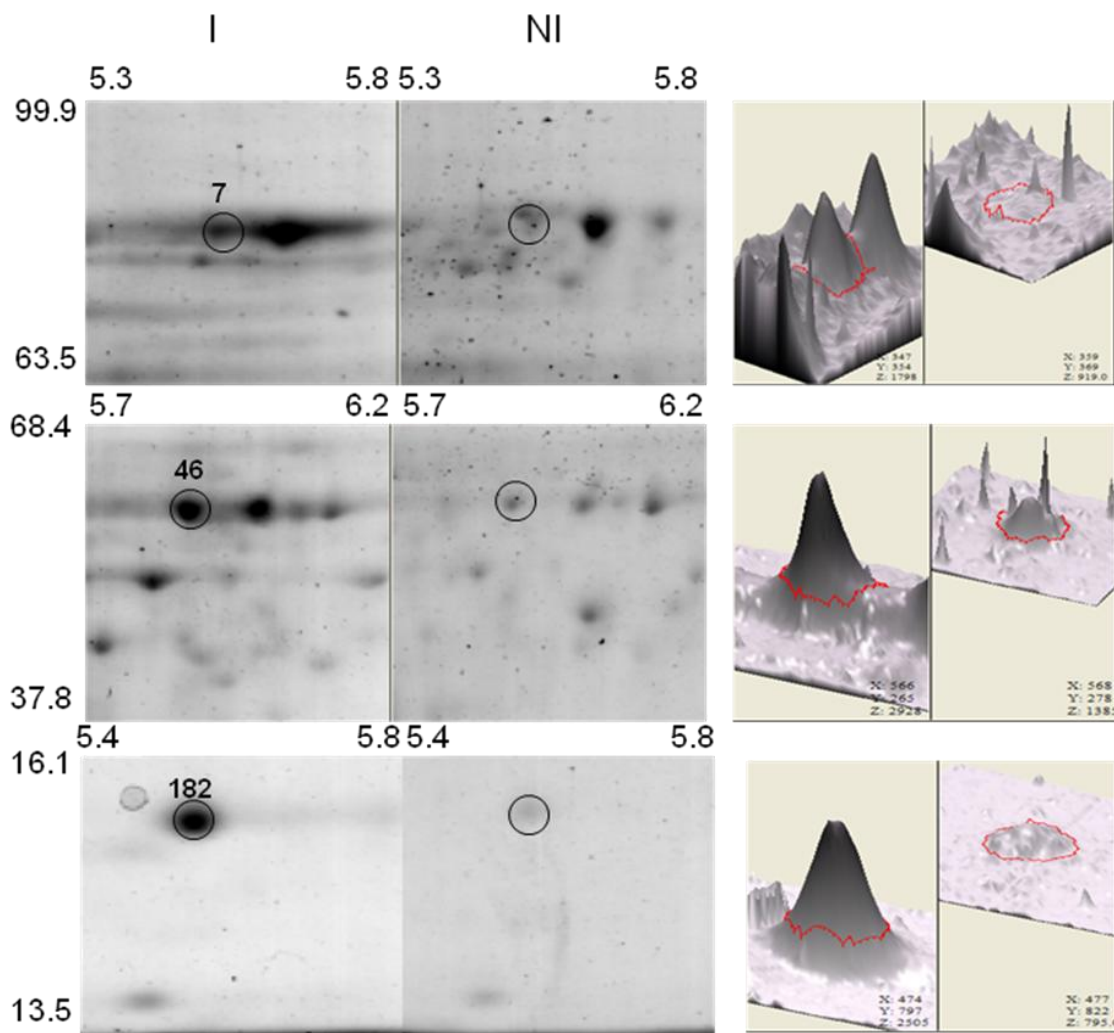


Figure 4 - Sections of 2-DE gels showing amplified spots differentially expressed between infective promastigotes (I) and non-infective (NI) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Spots number: 7 - HSP70; 46-trypanothione reductase; 182 - Cytosolic trypanredoxin.

Proteins involved in protein synthesis were also identified. Of particular interest, the elongation factor 1-beta (EF-1 β). In addition to its role in protein synthesis, the complex EF-1 is implicated in other cellular processes such as, signal transduction, apoptosis [52], and the survival of amastigotes in macrophages [53]. Another elongation factor-EF-1 α was identified in the 2-dimensional gel which according to previous studies was classified as a candidate virulence factor in *L. donovani* by its selective interaction with tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) that leads to inactivation of macrophages [53].

Table 1 – Proteins identified in the Mascot® database at 2-DE gels of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes by mass spectrometry (ESI-QTOF).

<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> promastigotas								
Spot n°	Protein name	NCBI accession code	M.WT (kDa)	Calculated pI value	Mascot Score	% Coverage	Macht/no. peptides	Peptides sequences
6	heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146093966	72089	5.80	282	11	8/38	DAGVELKEINDVVLVGGMTR, EINDVVLVGGMTR, EINDVVLVGGMTR, GLVLLDVTPLSLGIETLGGVFTR, KSQTFSTAADNQTQVGIK, SQTFSTAADNQTQVGIK, ELVEVRNNAETQLTTAER
7	heat shock protein 70 [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 293059	71382	5.46	111	5	4/120	AVVTVPAYFNDSQR, QATKDAGTISGLEVLR, AGTISGLEVLR, NTTIPTKK
8	heat shock protein 70 [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 293059	71382	5.46	99	4	4/107	QATKDAGTISGLEVLR, DAGTISGLEVLR, STIQPVER, NTTIPTKK
14	heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146093974	72119	5.70	1847	46	48/132	VLENSEGF, VLENSEGFRTTPSVVAFK, TTPSVVAFKGSEK, GSEKLVGLAAK, LVGLAAKR, QAITNPQSTFYAVK, QAITNPQSTFYAVKR, QAITNPQSTFYAVKR, RFEDEHIQK, EDEHIQK, NVPYKIVR, MKETAENFLGHK, MKETAENFLGHK, VSNAVVTCPAYFNDAQR, QATKDAGTIAGLNVIR, DAGTIAGLNVIR, DAGTIAGLNVIR, VVNEPTAAALAYGMDK, VVNEPTAAALAYGMDK, VNEPTAAALAYGMDKTK, TSGIDLSE, TSGIDLSKEM, TSGIDLSKER, SKFEGITQR, SKFEGITQR, LIDRSIAPCK, SIAPCKQCMK, EINDVVLVGGMTR, EINDVVLVGGMTR, VEEVKK, FFQKDPFR, GVPNDEAVALGAATLGGVLR, GVPNDEAVALGAATLGGVLR, GVPNDEAVALGAATLGGVLRGDVK, GVPNDEAVALGAATLGGVLRGDVK, GLVLLDVTPLSLGIETLGGVFTR, GLVLLDVTPLSLGIETLGGVFTR, NTTIPTKK, SQTFSTAADNQTQVGIK, VFQGEREMAADNQMMGQFDLVGIPPAPR, VFQGEREMAADNQMMGQFDLVGIPPAPR, VFQGEREMAADNQMMGQFDLVGIPPAPR, VFQGEREMAADNQMMGQFDLVGIPPAPR, VFQGEREMAADNQMMGQFDLVGIPPAPR, VFQGEREMAADNQMMGQFDLVGIPPAPR, EMAADNQMMGQFDLVGIPPAPR, NNAETQLTTAER, TLVAELR, LVAELRK
15	heat shock protein 70 [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 293059	71382	5.46	77	4	3/126	DAGTISGLEVLR, VQSLVSDFFGGK, VQSLVSDFFGGKELNK
30	ATPase beta subunit [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146088806	56485	5.14	881	32	29/74	CIAMQTTDLLL, CIAMQTTDLLL, CIAMQTTDLLKLS,

								VVSTGGNISVPVGR, VVSTGGNISVPVGRETLLGR, IFNVLGDAIDQR, IFNVLGDAIDQRGPVGEM, GPVGEMR, MAIHAEAPL, MAIHAEAPL, MAIHAEAPL, MAIHAEAPL, LADQAAEDTILTTGIV, EGTDLYLEMMQSV, EGTDLYLEMMQSV, EGTDLYLEMMQSV, VIDLKGESC, CVLVYGMNEPPGAR, CVLVYGMNEPPGAR, CVLVYGMNEPPGAR, CVLVYGMNEPPGARAR, AVAESGIYPAVNPLECASR, IMDPDVIDVDHYNVAQDIVQMLTY, IMDPDVIDVDHYNVAQDIVQMLTY, MAEAAAAMEK, K, MAEAAAAMEK, MAEAAAAMEQ, MAEAAAAMEKQR, MAEAAAAMEKQR
31	ATPase beta subunit [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146088806	56485	5.14	324	21	8/57	CIAMQTTDLLK, VVSTGGNISVPVGRETLLG, IFNVLGDAIDQRGPVGEM, GPVGEMR, MAIHAEAPK, VIDLKGESK, AVAESGIYPAVNPLECASR, IMDPDVIDVDHYNVAQDIVQMLTK
38	trypanothione reductase [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 104745490	51902	5.74	154	7	6/94	QLEANGIQVR, SQALQLDK, SQALQLDKAGVK, SQALQLDKAGVK, TSMDNIYAIGDVTSR, TSMDNIYAIGDVTSR
41	p45 [<i>Leishmania major</i>]	gi 6274526	40723	6.61	48	2	1/19	LGDDTITAK
43	elongation factor 1-alpha [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146083153	49497	9.03	259	16	8/31	IGGIGTVPVGR, VETGIMKPGDVVTFAPANVTTEVK, VETGIMKPGDVVTFAPANVTTEVK, SIEMHHEQLAEAPGDNVGFNVK, FAEIESK, AIKSGDAAIVK, SGDAAIVK, SGDAAIVK
46	trypanothione reductase [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 104745490	51902	5.74	314	12	9/59	QLEANGIQVR, TKLSPTK, SQALQLDK, SQALQLDKAGVK, SQALQLDKAGVK, TGKNDAVLVDAYS, TGKNDAVLVDAYS, TSMDNIYAIGDVTSR, TSMDNIYAIGDVTSR
60	52 kDa PDI [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 116293933	52634	5.13	378	16	12/47	TAAGIASYMK, TAAGIASYMK, TAAGIASYMK, AQVGPSMK, AQVGPSMK, AGELEDLKK, EAFPVCVVK, EAFPVCVVT, TASADSEMALMMTK, SFESENVIIAK, SHLTASAGPSDKSDEEDL, SHLTASAGPSDKSDEEDL, SHLTASAGPSDKSDEEDL
63	52 kDa PDI [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 116293933	52634	5.13	632	25	23/74	TLAPEFIK, TAAGIASYMK, TAAGIASYMK, TAAGIASYMK, AQVGPSMK, AQVGPSMK, AQVGPSMK, EAFPVCVVK, TASADSEMALMMTK, TASADSEMALMMTK, TASADSEMALMMTK, TASADSEMALMMTK, TASADSEMALMMTK, SQVLLTYIDGDQYRPVSR,

76	Actin	gi 1168337	42249	5.40	97	8	2/43	MGLSPNDSRLVEIS, SIACAVSNLYEDPDDACCMFTSQ, IPALGATLNMGGDDKTAVSAVLQNI
85	HSP83 heat shock protein 83-1	gi 123665	81046	5.00	211	5	4/24	GFSGDDAPR, SANEEAFELPDGNVMMVGNQF ADLVNNLGTIAR, EVTKEYEVQNK, YQSLTDPVSLGDATR, YQSLTDPVSLGDATRLCVR
86	beta tubulin	gi 129683	59302	4.69	188	16	5/28	INVYFDESAGGR, INVYFDESAGGRYVPR, EAESCDCLQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLISK, GLSVAELTQQMFDAN, YLTASALFR
88	beta tubulin [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146078079	50334	4.74	1227	49	40/111	MREIVSCQAGQCGNQIGSF, MREIVSCQAGQCGNQIGSF, EIVSCQAGQCGNQIGSF, INVYFDESAGGY, INVYFDESAGGRYVPR, VLMLEPGTMDSVR, VLMLEPGTMDSVR, VLMLEPGTMDSVR, GHYTEGAELIDSVLDVCK, GHYTEGAELIDSVLDVCRE, EAESCDCLQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLISL, EAESCDCLQGFQLSHSLGGGTGSGMGTLISL, IMMTFSVIPSPV, FPGQLNSDLK, FPGQLNSDLK, FPGQLNSDLRL, LAVNLVPFPL, LAVNLVPFPL, GSQQYRGLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDANKMMQAADPH, NMMQAADPH, NMMQAADPH, NMMQAADPH, NMMQAADPRHGY, NMMQAADPRHGY, HGRYLTASALFG, YLTASALFG, MSTKEVDEQMLNVQNN, MSTKEVDEQMLNVQNN, MSTKEVDEQMLNVQNN, EVDEQMLNVQNN, EVDEQMLNVQNN, NSSYFIEWIPNNIS, SSICDIPPG, SSICDIPPG, SSICDIPPKGLM, SSICDIPPKGLM, SSICDIPPKGLM
89	beta tubulin	gi 13569565	50394	4.74	587	36	19/124	MREIVSCQAGQCGNQIGSF, MREIVSCQAGQCGNQIGSF, VLMLEPGTMDSVR, VLMLEPGTMDSVR, VLMLEPGTMDSVR, GPYGQLFRPDNFIFGQSGAGNNWAG, GHYTEGAELIDSVLDVCK, GHYTEGAELIDSVLDVCRE, LAVNLVPFPL, GSQQYRGLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDAN, HGRYLTASALFG, YLTASALFG, EVDEQMLNVQNN, NSSYFIEWIPNNIS, SSICDIPPG, SSICDIPPKGLM, SSICDIPPKGLM
109	elongation factor 1-beta [<i>Leishmania major</i>]	gi 157875576	25630	5.15	70	6	3/69	KAWGAPVV, VAAPPELM, VAAPPELM
114	alpha tubulin [<i>Leishmania donovani</i>]	gi 606648	50512	4.89	262	14	6/63	CIFLDLEPTVVDEVV, CIFLDLEPTVVDEVV, RTGTYQ, QLFNPEQLVSGKEDAANNYAG, LSVVYDGKS,

117	beta tubulin	gi 135485	50647	4.72	145	11	6/14	RSLDIERPSYTNVNL, SLDIERPSYTNVNL MREIVSCQAGQCGNQIGSF, MREIVSCQAGQCGNQIGSF, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, GHYTEGAELIDSVLDVCRE
118	beta tubulin	gi 135485	50647	4.72	207	15	7/45	MREIVSCQAGQCGNQIGSF, MREIVSCQAGQCGNQIGSF, INVYFDESAGGRYVPR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, GHYTEGAELIDSVLDVCRE
119	beta tubulin	gi 135485	50647	4.72	219	13	8/48	MREIVSCQAGQCGNQIGSF, MREIVSCQAGQCGNQIGSF, INVYFDESAGGRYVPR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, VLMDLEPGTMDSVR, LAVNLVPPFL
125	14-3-3 protein-like protein <i>Leishmania major</i> chr 36	gi 157877138	29783	4.79	384	43	9/98	LAEEAERFDEMLLCIK, LNSELDTEEN, LNSELDTEERNLLSVAYN, VITSEIE, ENAKENSATLPFVVNMR, YYAEIDSGDGQQ, QAYDEAVTELETLDDDEAYHESNTIVL, LLRENLNLTDDQL, LLRENLNLTDDQL
126	enolase [<i>Leishmania mexicana</i>]	gi 77176833	46616	5.60	84	6	2/49	LGANAILGCSMAISK, QIVGDDLTVTNVEV
147	mitochondrial tryparedoxin peroxidase [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 61619796	25556	6.90	103	7	4/34	NVDEALV, GEFFEN, GEFFENKM, GEFFENKM
163	ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	gi 154334466	21690	6.74	97	8	1/17	NCPPDLETYNATLQI
164	cytochrome c oxidase subunit V [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146089942	22382	6.10	132	15	6/46	TQYASTMDPD, TQYASTMDPD, TQYASTMDPRDADVLR, TQYASTMDPRDADVLR, DADVLR, SLETMKWEATPG
167	nucleoside diphosphate kinase [<i>Trypanosoma brucei</i>]	gi 5726483	16832	9.01	79	13	3/22	TFIAVKPDGVQN, TFIAVKPDGVQN, GDFAVDVGN
182	cytosolic tryparedoxin [<i>Leishmania donovani</i>]	gi 157781821	16680	5.23	92	11	2/51	HALTQDPEGAQFPWRDE, HALTQDPEGAQFPWRDE
189	hypothetical protein [<i>Leishmania major</i> strain Friedlin]	gi 157866166	13379	5.26	219	33	8/60	FGYVDYTK, NQGVVEVK, NQGVVEVKI, KICTSR, QFDDVS, RAEAGEADDE, RAEAGEADDE, RAEAGEADDE
199	ATPase beta subunit, putative	gi 146088806	56485	5.14	503	28	17/61	CIAMQTTDLLL, CIAMQTTDLLL, VVSTGGNISVPVGE, VVSTGGNISVPVGRETLGI, IFNVLGDAIDQG, IFNVLGDAIDQRPVGE, GPVGEKMM, MAIHAEAPL, MAIHAEAPL, MAIHAEAPL, EGTDLYLEMMQSV, VIDLKGESC, CVLVYGMNEPPGAR, CVLVYGMNEPPGAR, VAESGIYPAVNPLECASI, IMDPDVIDVDHYNVAQDIVQMLTY, MAEEAAAMEQ
234	heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor, putative	gi 57015345	68915	5.52	245	8	6/22	VLENSEGFT, NVPYKIVR, QATKDAAGTIAGLNVIV, DAGTIAGLNVIV, TSGIDLSKEM, SKFEGITQL

290	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16; mitochondrial processing peptidase, beta subunit [<i>Leishmania infantum</i>]	gi 146100801	55009	6.61	306	23	11/40	RPASNHATSAAFE, RPASNHATSAAFREVLSI, VACEENPLSL, LATVGVWMDAGSRYEPIAYAGTAV, MEDADIVK, MEDADIVK, MEDADIVKAR, MEDADIVKAR, CAFDSTPYGVGTPLYGTEEGVKV, ATVIPESY, TFSSLDHSTPTNTHFNES
306	alpha tubulin [<i>Leishmania donovani</i>]	gi 606648	50512	4.89	252	17	5/16	CIFLDLEPTVVDEVV, CIFLDLEPTVVDEVVTRGTGYQ, QLFNPEQLVSGKEDAANNYAG, SLDIERPSYTNVNL, YHEQLSVADITNSVFEPAGMLTC
330	reiske iron-sulfur protein precursor [<i>Leishmania major</i> strain Friedlin]	gi 72547588	34062	5.93	258	24	9/25	VSLVFKQLEGNMPLTK, VSLVFKQLEGNMPLTK, YAKYSDPALCDVDSDEVVLTYPGAPQGI, YSDPALCDVDSDEVVLTYPGAPQGI, LADDMEDR, LADDMEDRAV, LADDMEDRAV, IRQGPAPLNLEVPPYW, QGPAPLNLEVPPYW
334	14-3-3 protein-like protein [<i>Leishmania infantum</i>]	gi 146104107	29826	4.79	138	18	3/52	QAALNAYQK, QAYDEAVTELETLDDDEAYHESNTIVL, LLRENLNLTDDQL
335	hypothetical protein [<i>Leishmania infantum</i>]	gi 146102652	29168	5.82	159	12	4/26	LYASDFER, IYVAPGKEQDR, TTWEDNIETEVLK, TTWEDNIETEVRLY
340	hypothetical protein [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146087498	27651	8.24	114	9	3/48	VLSGVSPSEGAMEK, VLSGVSPSEGAMEK, ETTVAALLI
343	mitochondrial tryparedoxin peroxidase [<i>Leishmania amazonensis</i>]	gi 61619796	25556	6.90	119	7	4/26	NVDEALV, GEFFEN, GEFFEKNM, GEFFEKNM
348	ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	gi 154334466	21690	6.74	58	8	1/23	NCPPDLETYNATLQI
352	beta-tubulin [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904]	gi 154343852	20608	4.67	300	41	11/72	MMGFAPLTSG, MMGFAPLTSG, MGFAPLTSG, MGFAPLTSG, GSQQYRGLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDAN, GLSVAELTQQMFDAN, NMMQAADPH, HGRYLTASALFG, EVDEQMLNVQNN, VGEQFTGMFR
353	ATP synthase, epsilon chain [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146094218	20461	5.02	118	7	3/52	IGVLESVIQSLK, IGVLESVIQSLKHA, IGVLESVIQSLKHA
354	ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146081834	21617	6.74	194	26	6/74	YYDEAGEVLVNMNVN, IYEAPSQ, FCAMMDLMEEMQHN, LGYCVL, LGYCVAKLMEAEFR, LMEAEFR
355	cytochrome c oxidase subunit V [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5]	gi 146089942	22382	6.10	326	57	15/81	KPEVNDRIT, TQYASTMDPD, TQYASTMDPD, TQYASTMDPRDADVLR, TQYASTMDPRDADVLR, VFLPPLGDPHRLLC, CYSLMAYPILDDKGGQLV, CYSLMAYPILDDKGGQLV, VVIPHMELVEYLAS, SLETMKWEATPG, SLETMKWEATPG, SLETMKWEATPG, GAASLLESLYG, GAASLLESLYG, GAEIPDHVFQTPAVIEL

Table 2 - Biological processes categories of the identified proteins from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* by mass spectrometry.

Categories ^a	Number of identified spots	Present in infective	Present in non- Infective
<i>Structural</i>			
Actin	1	x	x
α - Tubulin	2	x	x
β - Tubulin	7	x	x
<i>Protein folding / response to stress</i>			
HSP70	6	x	x
HSP83	1	x	
52 kDa PDI, Protein disulfide isomerase	4	x	x
<i>Antioxidant / Detoxification</i>			
Mitochondrial trypanedoxin peroxidase	2	x	x
Cytosolic trypanedoxin	1	x	x
Trypanothione reductase	2	x	x
<i>Metabolism of nucleic acids</i>			
ATP synthase, epsilon chain putative	1	x	x
<i>ATP hydrolysis</i>			
ATPase beta subunit, putative	3	x	x
<i>Protein synthesis</i>			
Elongation factor 1-alpha	1	x	
Elongation factor 1- beta	1	x	x
<i>Carbohydrate metabolism</i>			
Enolase	2	x	x
<i>Metabolism of purine / pyrimidine</i>			
nucleoside diphosphate kinase	1	x	
<i>Cellular respiration</i>			
Cytochrome c oxidase subunit V	2	x	x
reiske iron-sulfur protein precursor	1	x	x
<i>unknown biological process</i>			
3-ketoacyl-coa thiolase-like protein	1	x	
14-3-3 protein-like protein	2	x	x
ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor	3	x	x
hypothetical protein	3	x	x
metallo-peptidase, Clan ME, Family M16; mitochondrial processing peptidase, beta subunit	1		x
p45	1	x	x

Within the group of detoxification and antioxidant proteins, considered important in the survival of the parasite within the host cell, was confirmed the presence of five spots identified as: trypanedoxin mitochondrial peroxidase, cytosolic trypanedoxin and trypanothione reductase. The three proteins were common in both conditions, however the

proteins cytosolic trypanredoxin and trypanothione reductase spots were 5 fold more abundant in infective promastigotes (Figure 4), while the mitochondrial peroxidase trypanredoxin was similarly expressed in both conditions (0.404/0.400). In the functional category of carbohydrate metabolism, a glycolytic enzyme, enolase, was identified in both infectivity conditions with similar percentual of volume (0.272/0.204). This enzyme also participates in the metabolism of nucleoside diphosphate kinase. As well as maintaining the important functions of cell metabolism this enzyme prevents the ATP - mediated lysis by in macrophages infected with *L. amazonensis*, thus preserving the integrity of host cells for the benefit of the parasite [54,55].

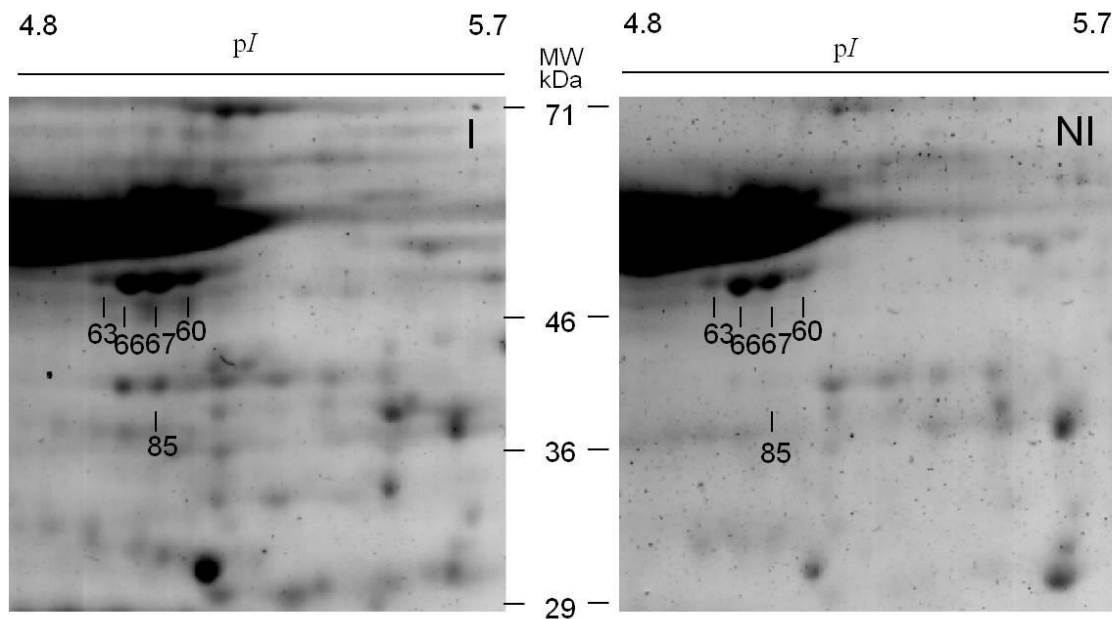


Figure 5 - Sections of 2-DE gels showing amplified spots differentially expressed between infective promastigotes (I) and non-infective (NI) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Spots number: 60, 63, 66, 67 – protein disulfide isomerase 52 kDa (PDI); 85 – heat shock protein 83 kDa (HSP83).

4. DISCUSSION

The systems for assessing infectivity *in vitro* and *in vivo* confirmed the status of the strains analyzed and showed that *in vitro* culture for a long time period causes change in the infective state of *L. amazonensis*. Similar results were reported by Grimaldi et al. [56], who found that amastigotes and promastigotes freshly isolated *in vitro* produced more nodular lesions in animals and had a larger number of protein bands on polyacrylamide gels than those maintained *in vitro* for many passages. This suggests that adaptive changes modify the development. The literature indicates that specific factors and nonspecific immune response of the host are involved in controlling disease progression and also that the survival of the parasite depends on the ability of promastigotes and amastigotes to evade adaptive mechanisms so as to establish the vertebrate host's infection [57]. Thus, for the establishment of the infective state, it is necessary to have a series of surface molecules, including LPG and

GP63. One of the roles of these molecules is to mediate the interaction of the parasite with the macrophage receptors, thus facilitating its internalization. In order to establish the infection, the parasite uses several mechanisms to evade the vertebrate hosts' immune response, including inhibition of host cell apoptosis, both observed *in vitro* [58] and *in vivo* experiments. In addition to LPG and GP63, another parasite's surface molecule, GIPL (glycosylinositolphospholipids) seems to have an important role in the binding to the macrophage, since antibodies against this molecule blocked the internalization of the protozoan [59]. Hence, *Leishmania* has to survive the phagocytosis process that involves the target cell invasion, the inhibition to the formation of phagolysosome and hydroxyl radicals and the removal of superoxide anions by LPG. The inhibition to the degradation of phagolysosome enzymes by GP63, the transformation into amastigotes that are more resistant to the enzymes' nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) and the acidic pH of the phagolysosome [60], so as to establish the infection. All of these events depend on the expression of several proteins that interact in a complex system of regulation. The outcome of *Leishmania* infections is determined by both species: parasite, host and their genetic make-up. Although much has been learned about the immune response to this parasite, knowledge about the factors derived from the parasite is still limited. The recent completion of genome sequences for *L. major* projects and *L. infantum*, as well as other species of the genus, in agreement with the simultaneous advance of proteomics, has greatly accelerated and favored the pursuit of new proteins of *Leishmania*.

The first proteomic comparison between infective and non-infective forms was performed by Mojtahedi *et al.* [61] who studied procyclic and metacyclic promastigotes of *L. major*. In previous work, the authors only had compared different evolutionary forms as promastigotes and amastigotes [16,62-66]. In all these studies there was a quantitative and qualitative difference in protein expression between specific stages of several species of *Leishmania*. Some proteins considered as prior have been identified as common or specific amastigotes and promastigotes (infective and non-infective) [62, 67-69]. Polypeptides are differentially expressed during the changes of shape. Infectivity and virulence have been detected using single or two-dimensional electrophoresis [56,61,70-73].

The differential expression of proteins between infective and uninfected promastigotes can be divided into three groups: (i) proteins that are expressed in both stages, (ii) proteins that are preferentially expressed in the infective stage, and (iii) proteins expressed exclusively in a non-infective stage. In this study, we observed a significant number of proteins related to cell motility and structure as α and β tubulin and actin in greater abundance in the infective promastigotes. The findings of Mojtahedi *et al.* [61] in *L. major* show this increase to be also observed in this form, which presents highest activity and motility, showing bursts of irregular motion characteristics when compared with procyclic promastigotes [8,74]. The findings of this study show a difference in expression between heat shock proteins in which HSP70 expression was higher in infective promastigotes while HSP83 was expressed exclusively in this phase. In the proteomic analysis of the differentiation of *L. mexicana*-related proteins such as heat shock HSP70 and HSP80 were present throughout differentiation with a small reduction in the abundance of HSP80 as parasites differentiated from promastigotes to amastigotes [16]. In *L. donovani* it is suggested HSP80 plays an important role in the amastigotes differentiation [75]. Like in other organisms, there is a basal level of HSP83 expression in *Leishmania* promastigotes at 26°C, but its expression is much higher in amastigotes and promastigotes submitted to high temperatures [76-78]. This oscillation in the expression of HSP70 has also been demonstrated in studies that linked this protein as a virulence factor and resistance to antimonials [47]. Differential expression of heat shock proteins in parasites that migrate between vertebrate and invertebrate hosts is of interest, since

the temperature rise is part of the life cycle, and induction of thermotolerance phenomenon is a normal physiological response that possibly contributes to virulence and ability to infect [79].

In our studies, the presence of HSP83 only in infective parasites and a greater abundance of this HSP70 stage also confirm the importance of these proteins for the survival of protozoa during the cycle. The PDI (52 kDa) found in this study are also participating in protein folding and has been involved with a possible virulence factor in *L. major* [80]. The involvement of this molecule with the virulence and pathogenicity in *Leishmania* was determined by Ben Achour *et al.* [80]. Studies of gene expression, which identified a gene (LmPDI) expressing high levels of protein in the virulent strains and inhibited when it affects the growth of the parasite, is a potential target of anti-*Leishmania* drugs. In both stages of *L. amazonensis* promastigotes PDIs proteins were present with a small decrease in non-infective condition. Although much has been learned about PDIs in higher eukaryotes, there are few data available on PDIs in pathogens that are important for human infections. Only two spots selected for identification were involved with protein synthesis (EF-1 α and EF-1 β). The main function and best-known EF-1 α is like a GTP-binding protein involved in rate regulation and fidelity of protein translation [81, 82]. In addition to this function it has been shown this protein participates in the deactivation of macrophages in *L. donovani*. Selective interaction with the host's tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) leads to a decrease in the expression induction of nitric oxide synthesis during macrophage activation by interferon- γ [53]. Due to the fact that this interaction leads to deactivation of macrophages, *Leishmania* EF-1 α is identified as a candidate virulence factor. Evidence that *Leishmania* EF-1 α may be a determinant of virulence combined with its significant structural and functional differences when compared with the protein in mammalian host, suggesting this may be an attractive target for anti-*Leishmania* drug or vaccine development. This potential can be even greater, given the essential requirement for EF-1 α in the synthesis of proteins and other critical cellular functions.

Within the complex EF-1 α , β and γ involved in protein synthesis, β and γ sub-units are involved in GDP-GTP exchange. The literature reports that the complex EF-1 β activity has trypanothione S-transferase and trypanothione peroxidase [83]. And that also was identified as a polypeptide associated with the metastatic phenotype of a clone *L. guyanensis* and therefore one of the factors involved in the spread of the parasite [65]. An interesting glycolytic enzyme known as enolase, which is involved in various physiological and pathophysiological conditions showed increased abundance of infective promastigotes in the two selected spots. It can be found in many prokaryotes and eukaryotes [84-86] located in cytoplasm, cell surface and nucleus of various mammalian cells, allowing their involvement in various cellular metabolisms. Originally characterized as an enzyme involved in glycolytic metabolism [54], cell surface enolase acts as a receptor for plasminogen [86,87]. With cleavage by plasminogen activator, it is converted into plasmin that can activate collagenase and degrade fibrin and several extracellular matrix proteins. These events are crucial in the dissolution of the fibrous tissue and cell invasion through the stroma [88]. By concentrating plasminogen on the surface through the enolase cells store an immediate source of proteolytic enzymes to assist the penetration of the extracellular matrix. Many pathogens, immune cells and tumor cells appear to adopt this strategy to invade tissues, which may be essential for systemic infection of pathogens, patrolling tissues of immune system cells, and metastasis of tumor cells. Enolase surface of Gram-positive bacteria are regarded as a virulence factor [89]. This glycoprotein has been found in *L. mexicana*, and reported to interact with plasminogen *in vitro* [90-92]. This interaction contributes to the virulence of the parasite that can be confirmed from the observed differences in lesion size and pattern of immunoreactivity with anti-*Leishmania* lesion between plasminogen deficient mice and wild-type [93]. The presence

of enolase on the surface of many invading pathogens and tumor cells, which play an important role in tissue invasion and metastasis, can serve as a factor in diagnosis / prognosis and a target for treatment of certain infections and cancers. Among the proteins that were specific for the infective form the nucleoside diphosphate kinase (NDK) was present in this study. This is a ubiquitous enzyme that catalyzes the transfer of NTP phosphate (nucleoside triphosphate) to NDP (nucleoside diphosphate) to maintain adequate levels of NTPs in cells [94]. Other functions have been attributed to NDK in different organisms, e.g, in regulating gene expression in mammalian cells [95], participating of purine salvage pathway of trypanosomatids [96] and bacterial pathogenesis [97]. Despite the importance and interest on the biochemical properties and functional significance of NDK pathogenic trypanosomatids, e.g, *Trypanosoma* spp. [98, 99] and *Leishmania* spp. [100], little has been studied in this field. Recent studies demonstrated that the NDK plays a role in *Leishmania* infection of macrophages in both early stages of promastigote and in the chronic phase by amastigotes. Besides reducing microbial activity of nitric oxide from macrophages and preventing their cytolysis decreasing extracellular ATP NDK *Leishmania* intracellular and extracellular ATP can potentially be used to produce different NTPs. These nucleotides, namely, GTP and UTP are known to regulate the expression of genes in signaling pathways and therefore may also alter the macrophages, making them favorable to establish intracellular parasitism by *Leishmania* [55]. Interest in the study of these protozoa is not roused only because they cause human disease, but also as models of intracellular parasitism.

5. CONCLUSION

Given the findings presented in 2-DE maps and the identification of proteins present in the forms studied was concluded that the infectivity and virulence of promastigotes of *L. amazonensis* may be related to a set of proteins expressed which is different for each phase. Among these we highlight the proteins HSP70 and HSP83, EF-1 α , enolase and NDK. Our study demonstrates that high-resolution, reproducible 2-DE is a powerful tool to document protein expression profiles of *L. amazonensis*. The reproducibility and the possibility to make comparison gel-to-gel, will encourage studies to identify some of these differentially expressed proteins, and, in conjunction with immunological methods in a future studies, may lead to the identification of essential parasite proteins and the development of new *Leishmania* control strategies.

Acknowledgements

We thank Dr. Adriana Franco Paes Leme and her group from the BioSciences National Laboratory/CNPEM/ABTLuS for their precious contributions to this protein identification and the MS facilities. We are also indebted to Anita Lima de Souza and Isabelle Bezerra Cordeiro for protein digestion; Dr. Jorge Luiz López-lozano (Tropical Medicine Institution) for encouragement to carrying out this study as well as acquiring financial support, Dr. Paulo Nogueira (FIOCRUZ/Manaus) for the *in vitro* macrophage infection, and Mr. Jorge Manuel Antunes for his great help in correcting the final English version of the original manuscript. This work was supported by PPSUS/FAPEAM (project n°. 047/2006) and PROTEAM (FAPEAM/SECT-AM, project 901/2003; FINEP project 01/04/0609; 01/07/0768/00). LCR is a Ph.D. student of the Biotechnology Program at the UFAM Multidisciplinary Post-Graduation and is a FAPEAM fellowship recipient.

REFERENCES

- [1] Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in *Leishmaniasis*. Lancet 2005;366:1561–77.
- [2] Pearson RD, Wheller DA, Harrison LH, Kay HD. The immunobiology of *Leishmaniasis*. Rev Infectol Dis 198;35:907-27.
- [3] Davidson RN. Visceral *Leishmaniasis* in clinical practice. J Infec Dis 1999;39:112-6.
- [4] World Health Organization 2004. Disponível em: <http://www.who.int/zoonoses/diseases/Leishmaniasis/en/>. Acessado em: 10 de março de 2005.
- [5] Walters L, Irons K, Chaplin G, Tesh R. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the Neotropical Sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 1993;30:699-718.
- [6] Vivenes MAL, Oviedo M, Márquez JC. Desarrollo de *Leishmania mexicana* y *Leishmania amazonensis* en *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae, Phlebotomine). Rev Colomb Entomol 2005;31:71-4.
- [7] Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science 1984;223:1417-9.
- [8] Bates PA. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. Exp Parasitol 1994;2:215-8.
- [9] Da Silva R, Sacks DL. Metacyclogenesis Is a Major Determinant of *Leishmania* Promastigote Virulence and Attenuation. Infect Immun 1987;55:2802-6.
- [10] Salotra P, Ralhan R, Sreenivas G. Heat stress induced modulation of protein phosphorylation in virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. Int J Biochem Cell Biol 2000;32:309-16.
- [11] Saraiva EM, Andrade AF, Pereira ME. Cell surface carbohydrate of *Leishmania mexicana amazonensis*: Differences between infective and non-infective forms. Eur J Cell Biol 1986;40:219–25.
- [12] Streit JA, Recker TJ, Filho FG, Beverley SM, Wilson ME. Protective immunity against the protozoan *Leishmania chagasi* is induced by subclinical Cutaneous infection with virulent but not avirulent organisms. J Immun 2001;166:1921–9.
- [13] Pham NK, Mouriz J, Kima PE. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. Infect Immun 2005;73:8322–33.
- [14] Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat Immunol 2002;3:1041–7.
- [15] Soares RMA, Santos ALS, Bonaldo MC, Andrade AFB, Alviano CS, Angluster J, Goldenberg S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: diferencial expression of proteinases cell-surface polypeptide in avirulent and virulent promastigotes. Exp Parasitol 2003;104:104-12.
- [16] Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero J, Smith DF. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. Mol Bioch Parasitol 2004;136:51–62.
- [17] Cuervo P, De Jesus JB, Junqueira J, A-Lima LM, González LJ, Betancourt L, Grimaldi JRG, Domont GB, Fernandes O, Cupolillo E. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Mol & Biochem Parasitol 2007;154:6-21.
- [18] Chakrabarty RS, Mukherjee H, Lu BS, Mcgwire KP, Chang MK, Basu. Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules GP63 and LPG. J Parasitol 1996;82:632–5.

- [19] Medina-Acosta E, Karess RE, Russell DG. Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. *Mol Biochem Parasitol* 1993;57:31–46.
- [20] Schneider P, Rosat JP, Bouvier J, Louis J, Bordier C. *Leishmania major*: Differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol* 1992;75:196–206.
- [21] Bouvier J, Bordier C, Vogel H, Reichelt R, Etges R. Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membranebound zinc endopeptidase. *Mol Biochem Parasitol* 1989;37:235–45.
- [22] Bouvier J, Schneider P, Etges R, Bordier C. Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. *Biochemistry* 1990;29:10113–9.
- [23] Beverley, S. M.; Turco, S. J. Lipophosphoglycan LPG and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol* 1998;6:35–40.
- [24] Desjardins M, Descoteaux A. Survival strategies of *Leishmania donovani* in mammalian host macrophages. *Res Immunol* 1998;149:689–92.
- [25] Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ, Beverley S. M.. The role of phosphoglycans in *Leishmania* - sand fly interactions. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:406–11.
- [26] Spath GF, Epstein L, Leader B, Singer SM, Avila HA, Turco SJ, Beverley SM. Lipophosphoglycan is avirulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:9258–63.
- [27] Ilg T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *EMBOJ* 2000;19:1953–62.
- [28] Ilg T, Demar M, Harbecke D. Phosphoglycan repeat deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice. *J Biol Chem* 2001;276:4988–97.
- [29] Garami A, Ilg T. The role of phosphomannose isomerase in *Leishmania mexicana* glycoconjugatesynthesis and virulence. *J Biol Chem* 2001;276:6566–75.
- [30] De T, Roy S. Infectivity and attenuation of *Leishmania donovani* promastigotes: association of galactosyl transferase with loss of parasite virulence. *J Parasitol* 1999;85:54–9.
- [31] Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. Roles of cysteine proteinase of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1998;1:455–60.
- [32] Wiese M. Amitogen-activated protein MAP kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. *EMBOJ* 1998;17:2619–28.
- [33] Zhang WW, Matlashewski G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:8807–11.
- [34] Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Oliviera M, Papadopoulou B. Disruption of the trypano-thione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBOJ* 1997;16:2590–8.
- [35] Hubel A, Krobisch S, Horauf A, Clos J. *Leishmania major* HSP 100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol* 1997;17:5987–95.
- [36] Mckean PG, Denny PW, Knuepfer E, Keen J, Smith DF. Phenotypic changes associated with deletion and over expression of a stage-regulated gene family in *Leishmania*. *Cell Microbiol* 2001;3:511–23.
- [37] Figueira LP, Zanotti M, Pinheiro FG, Franco AMR7. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos

- municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. Rev Soc Bras Med Trop 2008;41:512-4.
- [38] Novy FGE, Macneal WJ. On the cultivation of *Trypanosome brucei*. J Infect Dis New York 1904;1:1-30.
- [39] Nicole GL. Culture du parasite du Bouton d'Orient. CR Acad Sci 1908;146:842-3.
- [40] Doyle PS, Dwyer DM. *Leishmania*: Immunochemical comparison of the secretory (extracellular) acid phosphatases from various species. Exp Parasitol 1993;77:435-44.
- [41] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal Biochem 1976;72: 248-54.
- [42] Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 1988;9:255-62.
- [43] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 1975;250:4007-21.
- [44] Hanna SL, Sherman NE, Kinter MT, Goldberg JB. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Microbiology 2000;146:2495-508.
- [45] Gull K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. Ann. Rev of Microbiol 1999;53:629-55.
- [46] Salotra P, Chauhan D, Ralhan R, Bhatnagar R. Tumor Necrosis factor-alpha induces preferential expression of stress proteins in virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. Immun Lett 1995;44:1-5.
- [47] Brochu C, Haimeur A, Ouellette M. The heat shock protein HSP70 and Heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the Protozoan parasite *Leishmania*. Cell Stress Chaperon 2004;9:294-303.
- [48] Rico AI, Gironès N, Fresno M, Alonso C, Requena JM. The heat shock proteins, HSP70 and HSP83, of *Leishmania infantum* are mitogens for mouse B cells. Cell Stress Chaperon 2002; 7:339-46.
- [49] Kimura T, Nishida A, Ohara N, Yamagishi D, Horibe T, Kikuchi M. Functional analysis of the CXXC motif using phage antibodies that cross-react with protein disulphide-isomerase family proteins. Biochem J 2004;82:169-76.
- [50] Kimura T, Hosoda Y, Sato Y, Kitamura Y, Ikeda T, Horibe T, Kikuchi M. Interactions among yeast protein disulfide isomerase proteins and endoplasmic reticulum chaperone proteins influence their activities. J Biol Chem 2005;280:31438-41.
- [51] Tian R, Li SJ, Wang DL, Zhao Z, Liu Y, He RQ. The acidic C-terminal domain stabilizes the chaperone function of protein disulfide isomerase. J Biol Chem 2004;279:48830-5.
- [52] Ejiri S. Moonlighting functions of polypeptide longation factor 1: from actin bund lingtozinc-finger protein R1 – associated nuclear localization. Biosc Biotech Biochem 2002;66:1-21.
- [53] Nandan D, Yi T, Lopez M, Lai C, Reiner NE. *Leishmania* EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. J Biol Chem 2002; 277:50190-7.
- [54] Pancholi, V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. Cell Mol Life Sci 2001;58:902-920.

- [55] Kolli BK, Kostal J, Zaborina O, Chakrabarty AM, Chang K. *Leishmania* – released nucleoside diphosphate kinase prevents ATP – mediated cytolysis of macrophages. *Mol Biochem Parasitol* 2008;158:163-75.
- [56] Grimaldi GJR.; Moomem H, Soares MJ, Moriearty PL. Enzyme variation and difference in infectivity within a single strain of *Leishmania mexicana mexicana*. *Int J parasitol* 2002;12:185-89 .
- [57] Cunningham MJ. Genomics and proteomics: the new millennium of drug discovery and development. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000;44:291-300.
- [58] Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immun* 1994;153:2930-7.
- [59] Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 1998;28:121-34.
- [60] Reis LC, Brito MEF, Souza MA, Pereira VRA. Mecanismos imunológicos na resposta celular a humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Patol Trop* 2006;35:103-15.
- [61] Mojtahedi Z, Clos J, Kamali-Sarvestani E. *Leishmania major*: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Exp parasitol* 2008;119:422-429.
- [62] El Fakhry Y, Quellette M, Papadopoulou B. A Proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*; 2002;2:1007-17.
- [63] Bente M. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 2003;3:1811–29.
- [64] Mcnicoll F, Muller M, Cloutier S, Boilard N, Rochette A, Dube M, Papadopoulou B. Distinct 3'- untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem* 2005;280:35238-46.
- [65] Walker J, Acestor N, Gongora R. Comparative protein profiling identifies longation factor-1 beta and trypanredoxinperoxidase factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. *Mol Biochem Parasitol* 2006;145:254–64.
- [66] Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stage: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* 2007;152:35-46.
- [67] Beetham JK, Donelson JE, Dahlin RR. Surface glycoprotein PSA (GP46) expression during short and long term culture of *Leishmania chagasi*. *Mol and Biochem Parasitol* 2003;131:109-17.
- [68] Yao C, Donelson JE; Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 2003;132:1-16.
- [69] Turco SJ, Descouteaux A. The lipophosphoglycan of the *Leishmania* parasites. *Ann Rev Microbiol* 1992;85:85-94.
- [70] Forgber M, Basu R, Roychoudhury K, Theinert S, Roy S, Sundar S, Walden P. Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology. *Plos one* 2006;1:1-11.
- [71] Thiel M, Bruchhaus I. Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes. *Med Microbiol Immun* 2001;190:33-6.
- [72] González-Aseguinolaza G, Almazán F, Rodríguez Jf, Marquet A, Larraga V. Cloning of the GP63 surface protease of *Leishmania infantum* Differential post-translational

- modifications correlated with different infective forms. *Biochim et Bioph Acta* 1997;1361:92–102.
- [73] Katakura K, Kobayashi A. Acid Phosphatase Activity of Virulent and Avirulent Clones of *Leishmania donovani* Promastigotes. *Infect Immun* 1988;56:2856-60.
- [74] Sacks DL, Hieny S, Sher A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between nonvirulent and virulent developmental stages of *Leishmania major*. *J Immunol* 1985;135:564–9.
- [75] Wiesgigl M, Clos J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* 2001;12:3307–16.
- [76] Shapira M, Mcewen JG, Jaffe CL. Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J* 1988;7:2895–901.
- [77] Lawrence F, Robert-Gero M. Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three *Leishmania* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4414–7.
- [78] Van Der Ploeg LH, Giannini SH, Cantor CR. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science* 1985;21:1443-6.
- [79] Gorczynski RM. Immunization of susceptible BALB/c mice against *Leishmania braziliensis*. II. Use of temperature-sensitive avirulent clones of parasite for vaccination purposes. *Cell Immunol* 1985;94:11-20.
- [80] Ben Achour Y, Chenik M, Louzir H, Dellagi ANDK. Identification of a disulfide isomerase protein of *Leishmania major* as a putative virulence factor. *Infect Immun* 2002;70:3576–85.
- [81] Ryazanov AG, Rudkin BB, Spirin AS. Regulation of protein synthesis at the elongation stage. New insights into the control of gene expression in eukaryotes. *FEBS Lett* 1991;285:170-5.
- [82] Condeelis J. Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton. *Trends* 1995;20:69-70.
- [83] Vickers TJ, Wylie SH, Fairlamb AH. *Leishmania major* elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity. *J Biol Chem* 2004;279:49003–9.
- [84] Pancholi V, Fischetti VA. Alpha-Enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem* 1998;273:14503-15.
- [85] Quinones W, Pena P, Domingo-Sananes M, Caceres A, Michels PA, Avilan L, Concepcion JL. *Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase. *Exp Parasitol* 2007;116:241-51.
- [86] Redlitz A, Fowler BJ, Plow EF, Miles LA. The role of an enolase - related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur J Biochem* 1995;227:407-15.
- [87] Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 1991;30:1682-91.
- [88] Moscato S, Pratesi F, Sabbatini A, Chimenti D, Scavuzzo M, Passatino R, Bombardieri S, Giallongo A, Migliorini P. Surface expression of a glycolytic enzyme, alpha-enolase, recognized by autoantibodies in connective tissue disorders. *Eur J Immunol* 2000;30:3575-84.
- [89] Chhatwal GS. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends Microbiol* 2002;10:205-8.
- [90] Avilán L, Calcagno M, Figuera M, Lemus L, Puig J, Rodriguez AM. Interaction of *Leishmania mexicana* promastigotes with the plasminogen plasmin system. *Mol Biochem Parasitol* 2000;110:183-93.

- [91] Calcagno M, Avilán L, Colasante C, Berrueta L, Salmen S. Interaction of different *Leishmania mexicana* morphotypes with plasminogen. *Parasitol Res* 2002;88:972-978.
- [92] Vanegas G, Quiñones W, Carrasco-López C, Concepción JL, Albericio F, Avilán L. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res* 2007;101:1511-16.
- [93] Maldonado J, Calcagno M, Puig J, Maizo Z, Avilán L. A study of Cutaneous lesions caused by *Leishmania mexicana* in plasminogen-deficient mice. *Exp Mol Pathol* 2006;80:289-94.
- [94] Lascu I, Giartosio A, Ransac S, Erent M. The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomemb* 2000;32:227-36.
- [95] Postel EH. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenerg Biomemb* 2003;35:31-40.
- [96] Landfear SM, Ullman B, Carter NS, Sanchez MA. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. *Eukaryot Cell* 2004;3:245-54.
- [97] Chakrabarty AM. Nucleoside diphosphate kinase: role in bacterial growth, virulence, cell signaling and polysaccharide synthesis. *Mol Microbiol* 1998;28:875-82.
- [98] Ulloa RM, Muschietti JP, Veron M, Torres HN, Tellez-Inon MT. Purification and characterization of a soluble nucleoside diphosphate kinase in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1995;70:119-29.
- [99] Hunger-Glaser I, Hemphill A, Shalaby T, Hanni M, Seebeck T. Nucleoside diphosphate kinase of *Trypanosoma brucei*. *Gene* 2000;257:251-7.
- [100] De Oliveira AH, Ruiz JC, Cruz AK, Greene LJ, Rosa JC, Ward RJ. Expression in *E. coli* and purification of the nucleoside diphosphate kinase b from *Leishmania major*. *Protein Exp. Purif* 2006;49:244-50.