



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

**ANÁLISE DE PROTEÍNAS DO PLASMA DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE CUTÂNEA POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL**

LUANDA DE PAULA FIGUEIRA

Manaus

2013

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

LUANDA DE PAULA FIGUEIRA

**ANALISE DE PROTEÍNAS DO PLASMA DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE CUTÂNEA POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL**

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.

Orientação: Dr^a. Antonia Maria Ramos Franco

Co-orientação: Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira

Manaus

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica (Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

<p>Figueira, Luanda de Paula</p> <p><i>F475a</i> Análise de proteína do plasma de pacientes com leishmaniose cutânea por eletroforese bidimensional / Luanda de Paula Figueira. – Manaus, 2013.</p> <p>180f. il. color.</p> <p>Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>Orientador: Dr^a. Antonia Maria Ramos Franco</p> <p>Co-orientador: Flávia Regina Almeida Campos Naief Moreira</p> <p>1. Leishmaniose 2. Doenças parasitárias 3. Epidemiologia I. Franco, Antonia Maria Ramos(Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p> <p style="text-align: right;">CDU 2007 616.928.5:616.15(043.2)</p>

Sinopse:

A Região Norte possui a maior incidência de leishmaniose do país. Neste estudo, foram avaliados aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes com Leishmaniose Tegumentar no município de Rio Preto da Eva, AM, onde foram identificadas por eletroforese de isoenzimas três espécies circulantes: *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (Leishmania) amazonensis*. Também foram descritos 12 novos casos de *L. (V.) naiffi*, com destaque para os casos ocorridos em Estações Experimentais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Através de análise proteômica, foram identificadas expressões diferenciais de proteínas de fase aguda de infecção em plasmas de pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* durante a infecção.

Palavras-chave: Leishmaniose - Proteoma – epidemiologia

Dedicatória ...

*“Dedico este trabalho a meus pais, **Ana e Orlando**, a meus filhos, **Luíza e Mateus**, e a meu marido **Weber**”.*

AGRADECIMENTOS

- ✓ Agradeço a Deus.
- ✓ Aos pacientes que colaboram com a tese.
- ✓ À Dra. Antonia Franco, orientadora e amiga, que me permitiu trabalhar por dez anos no Laboratório de Leishmaniose, onde fui muito feliz. Obrigada por tudo.
- ✓ À Maricleide Naiff, pela amizade, carinho, conselhos e todo apoio durante o projeto.
- ✓ Aos amigos do INPA, Lourival, Ana Cleide, Artêmio, Francisco, Ivonei, Cândido, Paulo e em especial, Roberto Dantas pelo grande apoio durante os trabalhos de campo e amizade.
- ✓ A toda equipe do município de Rio Preto da Eva-AM, especialmente ao técnico Antônio José. Ao Laboratório de Nutrição/INPA, pela ajuda durante toda a tese.
- ✓ Aos amigos: Susi, Meire, Glenda, Jéssica, Camila, Bruno, Ângela, Carlinhos, Mara, Cláudia, Ana Cláudia e Renata.
- ✓ À Fabiane e Alana, por todo carinho, ajuda e imensa amizade. Amo vocês.
- ✓ Às amigas Sharala, Liliane e Flávia, fundamentais no desenvolvimento da tese, principalmente na parte proteômica.
- ✓ Ao Luís por estar sempre por perto e ajudar a todos nos momentos mais complicados. E Thaís pelas trocas de informações, amizade e incentivo.
- ✓ Às queridas Sônia e Flávia Leite, pela amizade e por me acolherem com tanto carinho em suas casas.
- ✓ À minha família. Em especial aos meus pais e irmã, Camila, pelo amor e dedicação. Às primas Izabel e Maíra, tias Bel e Zezé, entre outros. Weber, Luíza e Mateus pelo imenso amor, paciência e apoio.
- ✓ À Gabriela Rocha Cosendey.
- ✓ À Rede Proteômica do Estado do Amazonas na pessoa do seu Coordenador Prof. Dr. Jorge Luiz Lopéz-Lozano, por sempre estar disposto a colaborar;
- ✓ À FAPEAM e CNPq pela concessão da bolsa de estudo;
- ✓ Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e a Universidade Federal do Amazonas – UFAM que deram a oportunidade de realização deste trabalho.
- ✓ À instituição UNESP-Rio Claro, pela identificação das proteínas por espectrometria de massas.
- ✓ A todos que direta e indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Deficiente é quem consegue modificar a sua vida, aceitando as modificações dos outros e da sociedade, ignorando que é dono do seu destino; louco é quem não procura ser feliz com o que possui; cego é aquele que não vê o seu próximo morrer de frio, de fome, de miséria e só tem olhos para seus míseros problemas.”

Mário Quintana

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana representa um conjunto de doenças com características clínicas, imunológicas e patológicas distintas, cuja expressão depende de fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasito, incluindo a natureza da espécie de *Leishmania* infectante e fatores genéticos do hospedeiro. O estado do Amazonas é uma região endêmica para a Leishmaniose cutânea (LC). Neste estudo, foram analisados os aspectos clínicos e epidemiológicos de 90 pacientes com LC no município de Rio Preto da Eva, terceiro em número de casos no estado, onde foram identificadas por eletroforese de isoenzimas três espécies circulantes: *Leishmania (Viannia) guyanensis* (89%), *L. (V.) naiffi* (3,33%) e *L. (Leishmania) amazonensis* (7,77%). Também foram descritos 12 novos casos de *L. (V.) naiffi*, com destaque para os casos ocorridos em Estações Experimentais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Através da combinação da técnica de eletroforese bidimensional com espectrometria de massas ESI-QToF, foram analisadas as proteínas expressas diferencialmente em plasmas de pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* antes e pós tratamento com antimonial pentavalente e de doadores voluntários não infectados por esta espécie de patógeno, que é predominante na região. Verificou-se que pacientes infectados por esta espécie, apresentaram durante a doença maior expressão de proteínas da fase aguda de infecção, tais como fator B e H da via alternativa do Complemento, Proteína relacionada à Haptoglobina (HPR), Cadeia alfa do Fibrinogênio e uma menor expressão de Serotransferrina. Essas proteínas estão envolvidas no processo inflamatório da doença, sendo necessárias para a homeostase do organismo. O envolvimento destas proteínas na infecção por *L. (V.) guyanensis* necessita ser mais bem investigado.

Palavras-chave: Leishmaniose – Proteoma - Epidemiologia

ABSTRACT

The American Cutaneous Leishmaniasis is a group of diseases with clinical, immunological and pathological distinct, whose expression depends on factors related to the host and the parasite, including the nature of the infecting *Leishmania* species and host genetic factors. The state of Amazonas is an endemic region for cutaneous leishmaniasis (CL). In this study, we analyzed the clinical and epidemiological aspects of 90 patients with CL in Rio Preto da Eva, third in number of cases in the state, which were identified three species circulating by isoenzyme electrophoresis: *Leishmania (Viannia) guyanensis* (89 %), *L. (V.) naiffi* (3.33%) and *L. (Leishmania) amazonensis* (7.77%). 12 new cases were also described as *L. (V.) naiffi*, especially the cases occurred in experimental stations of the National Institute for Amazon Research. By combining the technique of two-dimensional electrophoresis with ESI-QToF mass spectrometry, we analyzed the differentially expressed proteins in plasma of patients infected by *L. (V.) guyanensis* before and after treatment with pentavalent antimony, volunteer donors not infected by this pathogen that is prevalent in the region. It was found that patients infected by this species showed higher expression in the disease of acute phase proteins of infection, such as Factor B and H of the alternative Complement pathway, Haptoglobin protein related (HPR), Fibrinogen alpha chain and a lower expression of Serotrasferrina. These proteins are involved in the inflammatory process of the disease, being necessary to the body's homeostasis. The involvement of these proteins in infection by *L. (V.) guyanensis* needs to be further investigated.

Keywords: Leishmaniasis - Proteome - Epidemiology

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL:

Tabela 1: Dose recomenda das drogas de primeira linha para o tratamento da LTA de acordo com WHO e Ministério da Saúde do Brasil.....	29
---	----

CAPÍTULO I:

Tabela. Dados clínicos - epidemiológicos de Leishmaniose Tegumentar em Rio Preto da Eva, Amazonas. Característica dos casos de acordo com a espécie de <i>Leishmania</i> identificada.....	54
--	----

CAPÍTULO II:

Tabela. Características clinica/epidemiológicas de pacientes infectados com <i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	74
--	----

CAPÍTULO III:

Tabela 1. Dados referentes à doença, ao tratamento e coleta de plasma dos pacientes com Leishmaniose cutânea causada por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> provenientes dos municípios de Manaus e Rio Preto da Eva, AM, Brasil, entre 2008 e 2011.....	88
Tabela 2. Características de indivíduos do grupo controle provenientes de Manaus, AM, Brasil.....	89
Tabela 3. Dados referentes aos géis selecionados para sequenciamento por espectrometria de massas ESI-QToF (Electrospray Ionization).....	91
Tabela 4. Categorias de processos biológicos de proteínas de plasmas de pacientes infectados por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> e de doadores voluntários, obtidas em géis 2-DE sequenciadas por espectrometria de massas (ESI-Q Tof) e identificadas no banco de dados NCBI.....	94

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL:

Figura 1 – Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> . Fonte: REITHINGER et al. (2007).....	12
Figura 2. Ciclo de transmissão da <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> na Amazônia brasileira. Fonte: BRASIL, 2010.....	35
Figura 3- Linha do tempo com publicações sobre proteômica de <i>Leishmania</i> spp.. Fonte: adaptado de Paape; Aebischer (2011).....	43

CAPÍTULO I:

Figura 1. Leishmaniose tegumentar americana em Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. Incidência da Leishmaniose Tegumentar Americana, no período de 2005 a 2011 (41).....	52
Figura 2. Lesões cutâneas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Rio Preto da Eva. Em sentido horário, lesões de pacientes infectados por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> (a, b), <i>Leishmania (V.) naiffi</i> (c, d) e <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (e).....	55
Figura 3. Imagem de satélite (a) mostrando a distribuição geográfica dos casos de LTA na rodovia AM010, atendidos no município de Rio Preto da Eva, no período de 2005 a 2012. Localização dos casos e distribuição por espécie de <i>Leishmania</i> isolada e identificada por eletroforese de isoenzimas. Em destaque, o assentamento Iporá, localizado no km 127 da rodovia AM 010. Mapa do assentamento Iporá (b) no município de Rio Preto da Eva, AM.....	56

CAPÍTULO II:

Figura 1. Mapa da Amazônia Central Brasileira, mostrando a localização das Estações Experimentais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas, Brasil. As setas indicam os locais onde houve a provável infecção humana de LTA por *Leishmania (Viannia) naiffi* de acordo com a informação dos pacientes. Fonte: <http://pdbff.inpa.gov.br/download/maping/regmanauspdbff.jpg>..... 71

Figura 2. Lesões ulceradas papulosas de pacientes com Leishmaniose cutânea infectados por *Leishmania (V.) naiffi*. A-B: isolados MHOM/BR/2010/IM5665; C-D: MHOM/BR/2009/IM5662..... 72

Figura 3. Espécies de flebotomíneos (*Lutzomyia* spp.) capturados e dissecados nas Estações Experimentais Porto Alegre e Esteio (Reserva Florestal ZF3), Manaus – Amazonas..... 75

CAPÍTULO III:

Figura 1. Níveis de intensidade de proteínas diferencialmente expressas em plasma de pacientes com Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* e grupo controle ($p < 0,05$). Legenda: AT: antes tratamento; PT: pós-tratamento com antimonial pentavalente; p: p valor. Os traços indicam as diferenças com relevância estatística das proteínas entre as condições estudadas..... 102

Figura 2. Spots diferencialmente expressos no gel 2-DE de poliacrilamida 12% (13 cm, pH 3-10) do paciente MHOM/BR/11/IM5775 antes do tratamento. Número de spots: 85, 90, 88, 94 e 286 - Isoforma I do fator H do Complemento; 159, 162, 167, 181, 183, 158, 163, 168, 170, 174, 177, 281, 478, 479 e 528 - Serotransferrin; 307, 314 e 527 -HPR; 160 e 471 - Isoforma I do fator B do Complemento; 216, 226, 229, 316 -Isoform 1 da cadeia alfa do Fibrinogênio..... 106

LISTA DE ABREVIATURAS

2-D	Segunda dimensão
2D-DIGE	<i>Difference in gel electrophoresis</i>
6PGDH	6-Fosfogluconato Desidrogenase
ACON	Aconitato Hidratase
ACR2	Arsenato redutase 2
ATP	Adenosina trifosfato
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos
CR1	Receptor do complemento 1
CR2	Receptor do complemento 2
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FMT-AM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
G6PDH	Glicose-6-fosfato Desidrogenase
gp63	glicoproteínas de 63 kDa
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HK	Hexoquinase
HUPO	Organização Internacional de Plasma Humano
IDH	Isocitrato Desidrogenase
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IEF	Focalização isoelétrica
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina

INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
kDa	Quilodalton
LC	Leishmaniose cutânea
LCAD	Leishmaniose cutânea anérgica difusa
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCDB	Leishmaniose cutânea disseminada “bordeline”
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LRV1	<i>Leishmania</i> RNA vírus 1
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
m/z	massa/carga
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MDH	Malato Desidrogenase
ME	Enzima Málica
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MS	Espectrometria de massas
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NK	Células <i>natural-killer</i>
NMG	Antimoniato de N-metilglucamina
NNN	Neal, Novy & Nicolle
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion óxido
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pI	ponto isoelétrico
PPP	Projeto Proteoma do Plasma Humano
RNA	Ácido ribonucleico
Sb III	Antimonial trivalente
Sb V	Antimonial pentavalente
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SGS	Estibogluconato de sódio
T CD4	Linfócito T CD4
T CD8	Linfócito T CD8
T CD25	Linfócito T CD25
TCM	Células T de memória central
TEM	Células T de memória efetora
TGF- β	Fator beta de crescimento e transformação
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
Th17	Linfócito T auxiliar do tipo 17
TLR2	Toll-like <i>receptor 2</i>
TLR3	Toll-like <i>receptor 3</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alpha
WHO	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

SUMÁRIO

	pág.
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	001
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	005
2.1- A leishmaniose.....	005
2.2- O gênero leishmania.....	008
2.3- Ciclo biológico e resposta imune.....	009
2.4- Aspectos clínicos da Leishmaniose tegumentar	018
2.5- Diagnóstico laboratorial	021
2.6- Tratamento.....	024
2.6.1- Antimonial pentavalente.....	024
2.6.2- Outros tratamentos.....	029
2.7- Doença humana no estado do Amazonas.....	030
2.8- Proteômica.....	035
2.8.1- Aplicações da Proteômica.....	039
3. OBJETIVOS.....	044
3.1- Geral.....	044
3.2- Objetivos específicos.....	044
4. CAPÍTULO I.....	045
5. CAPÍTULO II.....	066
6. CAPÍTULO III.....	082
7. DISCUSSÃO GERAL.....	134
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	140
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
10. ANEXOS.....	176

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) representa um conjunto de doenças com características clínicas, imunológicas e patológicas distintas, cuja expressão depende de fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasito, incluindo a natureza da espécie de *Leishmania* infectante e fatores genéticos do hospedeiro. Muitos destes parasitos são capazes de produzir um espectro de doença no lugar de uma única forma clínica no hospedeiro humano (RODRIGUEZ-BONFANTE et al., 2003; FARIA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2005; SILVEIRA et al., 2004; 2009). Características como o tipo de lesão e o conhecimento dos agentes etiológicos de cada região colaboram para o diagnóstico da doença (LAINSON; SHAW, 1987).

A leishmaniose está entre as dezessete doenças consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO) e ocupa a categoria de doenças emergentes e sem controle (LINDOSO; LINDOSO, 2009). No país, os casos continuam aumentando devido a fatores como desmatamentos, urbanização e migração de pessoas susceptíveis para áreas endêmicas (DESJEUX, 2001). A resistência dos parasitos ao tratamento e a coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), onde formas clínicas severas ocorrem, contribuem para o agravamento da doença (DAVIES et al., 2003; GUERRA et al., 2011).

No ano de 2011, o estado do Amazonas notificou 1.752 casos de LTA; os municípios de Manaus e Rio Preto da Eva contribuíram com mais de 50% dos mesmos (SINAN, 2012). São cinco as espécies relacionadas à infecção no estado: *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) guyanensis*, sendo a última a espécie prevalente, contribuindo com mais de 80% dos casos (NAIFF, 1998; ROMERO et al.,

2001a; 2002; FIGUEIRA et al., 2008; COELHO et al., 2010; GUERRA et al., 2011; CHRUSCIAK-TALHARI et al., 2011).

Além da forma cutânea, *L. (V.) guyanensis* pode causar a forma mucosa ao homem (NAIFF et al., 1988; GRIMALDI et al., 1991; NAIFF, 1998). Acredita-se que essa forma seja geralmente causada por disseminação hematogênica das leishmânias inoculadas na pele para as mucosas, entretanto, as lesões de pele próximas aos orifícios naturais também podem invadir mucosas por contiguidade (BRASIL, 2010). Segundo Guerra et al., (2011), esta espécie é o agente causador da forma mucosa em diversos pacientes que tiveram a forma cutânea tratada de forma inadequada na região Amazônica.

Atualmente, o controle da doença baseia-se na quimioterapia, uma vez que vacinas contra o parasito ainda estão em desenvolvimento (PALATNIK-DE-SOUSA, 2008; CHARMOY et al., 2010). O tratamento de primeira escolha contra a leishmaniose é o antimonial pentavalente (BERMAN, 1988; RATH et al., 2003), cuja eficiência tem sido comprometida pelo desenvolvimento natural de resistência dos parasitos (CROFT et al., 2006). Fato este também comprovado em pacientes infectados por *Leishmania (V.) guyanensis*, havendo necessidade de uma revisão cuidadosa do tratamento indicado (ROMERO et al., 2001b; NEVES, 2010).

A identificação das espécies de *Leishmania* que circulam em determinada região, principalmente onde as diferentes formas clínicas ocorrem simultaneamente, é de fundamental importância para o conhecimento ecológico e epidemiológico da infecção e planejamento de estratégias de controle da leishmaniose; como o tratamento precoce da forma cutânea da doença, que reduz a prevalência das formas graves, assim como sua morbidade e custos com o tratamento (GRIMALDI; TASH, 1993; CASTRO et al., 2005; BAÑULS et al., 2007; SILVEIRA et al., 2008; FRANÇA et al., 2009; COELHO et al., 2010; GUERRA et al., 2011). A eletroforese de isoenzimas é o método mais utilizado em estudos taxonômicos de

Leishmania, sendo considerada como padrão ouro de identificação por ser bastante sensível (WHO, 1990, CUPOLLILO et al., 2000; ANDRADE et al, 2005; COELHO, 2010).

O melhor conhecimento da fisiopatologia das doenças tem permitido a identificação de marcadores genéticos, bioquímicos e imunológicos que contribuem não só com o diagnóstico, mas também com a atividade e remissão dos processos patológicos (SCHRIEFER; CARVALHO, 2008). Esses biomarcadores consistem em qualquer molécula ou característica biológica que possa ser detectada e medida, revelando os processos biológicos normais, patogênicos ou a resposta farmacológica após intervenção terapêutica (CARVALHO et al., 2006).

A identificação de substâncias que indiquem a infecção por *Leishmania* em seres humanos tem importância tanto para o diagnóstico, confirmação da cura da doença, como também para a busca de alternativas de tratamento e vacinas. Para tal, o uso da tecnologia proteômica pode ajudar na identificação mais rápida de novas proteínas e na avaliação de seu padrão de expressão e de suas funções (CUNNINGHAM, 2000). 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 uma das melhores estratégias disponíveis para a identificação em larga escala do conjunto de proteínas resultantes da expressão gênica (MANN et al., 2001; NYMAN, 2001).

O estudo do plasma humano é um dos caminhos para a busca destes marcadores, pois o proteoma do plasma é suscetível de conter, se não todas, quase todas as proteínas humanas, bem como proteínas derivadas de diversos microrganismos (ANDERSON et al., 2002; 2004).

Este estudo torna-se então de particular interesse para a Saúde Pública do Estado do Amazonas, tanto pela identificação das espécies de *Leishmania* circulantes, quanto pela identificação e análise comparativa de proteínas presentes em plasma humano de pacientes

infectados por *L. (V.) guyanensis*, antes e após tratamento com antimônio pentavalente, e doadores saudáveis, através de géis bidimensionais associados à espectrometria de massas, possibilitando a descoberta de possíveis alvos biotecnológicos para o desenvolvimento de produtos que ajudem na prevenção, diagnóstico e/ou tratamento desta doença.

Esta tese foi dividida em três capítulos. Os dois primeiros se referem a dados epidemiológicos da doença no estado do Amazonas e o último, à identificação de proteínas em plasma de pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- A Leishmaniose

A leishmaniose compreende uma gama de doenças encontradas ao redor do mundo em regiões tropicais e subtropicais, cujas diferentes formas clínicas constituem um grave problema de Saúde Pública. A leishmaniose visceral (LV) pode ser fatal quando não tratada, a forma mucocutânea (LMC) pode causar mutilações, a cutânea anérgica difusa (LCAD) é de longa duração devido à resposta imune mediada por células deficientes, e a forma cutânea (LC), quando em múltiplas lesões, pode ser incapacitante (WHO, 2002; DESJEUX, 2004; CARVALHO et al., 2012). Em 2004, foi proposta a forma Leishmaniose cutânea disseminada “bordeline” (LCDB) como sendo intermediária entre Leishmaniose cutânea localizada e os polos extremos patogênicos LMC e LCAD (SILVEIRA et al., 2004; 2009).

Distribuída em cinco continentes, a Leishmaniose ocorre em 98 países onde anualmente são registrados 220.000 casos de Leishmaniose Cutânea e 58.000 de Leishmaniose Visceral, mas somente em dois terços dos países a notificação é compulsória, sendo o número de casos subestimados. Por estimativa, calcula-se que o número real de casos seja de aproximadamente 700.000 a 1200.000 para LC e de 200.000 a 400.000 para LV (WHO, 2010; ALVAR et al., 2012).

A forma tegumentar é endêmica em mais de 70 países, com 70 a 75% dos casos ocorridos no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru (WHO, 2010). No continente Americano, sua distribuição vai desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (BRASIL, 2010).

A LTA, segundo Lainson (2010), parece ser uma doença antiga, que afligia humanos em áreas tropicais e subtropicais do Novo Mundo, como sugerido em antigas peças de

cerâmica originárias do Peru e Equador (*huacos*). Essas peças geralmente retratavam rostos humanos com deformações graves, bastante similares às causadas pela leishmaniose mucocutânea. Ademais, historiadores da época da colonização ibérica relatavam com frequência a ocorrência de lesões cutâneas nos habitantes nativos.

Aos poucos foi ficando evidente que as lesões cutâneas chamadas de *uta* pelos índios peruanos e a doença mucocutânea conhecida como espundia eram disseminadas pela maior parte do continente latinoamericano, onde receberam diversas denominações. As lesões menos destrutivas eram chamadas de *uta seco*, úlcera de Velez, *ulcer de los chicleros*, *buba*, *úlcer de Baurú*, *ferida brava*, *botão do oriente*, *forest yaws*, *Baysore*, *pian-bois e bosch-yaws*; já as mais destrutivas receberam as seguintes denominações: *espundia*, *llaga corrosiva*, *cancro espúndico*, *nariz de tapir*, *tiacaraña*, *gangosa*, *ferida esponjosa*, e *cancro fagendênico*. No entanto, a etiologia destas lesões permaneceu desconhecida por muito tempo (LAINSON, 2010).

No Brasil, em 1925, Eduardo Rabello publicou o trabalho “Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil” onde conclui que a Leishmaniose tegumentar já existia no país desde muitos anos e distingue três períodos na história da doença: “o período das origens imprecisas” baseados em referências mais ou menos vagas, culminando com a data da verificação clínica do botão da Bahia e sua filiação ao botão endêmico dos países quentes: “o segundo período” vai desde os estudos baianos feitos em 1895 a 1909 quando se descobre que o agente etiológico responsável pelas úlceras de Baurú, podendo ser chamado período pré-microbiológico; “o terceiro período” chamado microbiológico, iniciado em 1910 com verificação do parasito em lesões de mucosas, com a descoberta da quimioterapia por Gaspar Vianna, e o reconhecimento dos aspectos epidemiológicos desta moléstia (COSTA, 1992).

A única indicação segura e talvez mais antiga da existência da doença no Brasil verifica-se em citação na tese de Tello, "Antigüedad de la syphilis en el Peru", de 1908,

relativa a 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).

De acordo com Lainson (2010), se considerarmos o impressionante número de espécies de *Leishmania* que foram registradas até o presente momento na região neotropical, e, particularmente, na região Amazônica, esta área poderia muito bem ser tida como o local de origem deste gênero. Esta hipótese é corroborada pela observação de que muitos destes parasitos (espécies do subgênero *Viannia*) mantiveram o seu desenvolvimento no intestino posterior no hospedeiro flebotomíneo, o que seria remanescente do ciclo de vida de flagelados monóxenos de insetos dos quais as espécies de *Leishmania* teriam evoluído.

Segundo Altamirano-Enciso et al. (2003), o processo de dispersão da LTA no Brasil é relativamente recente, ocorrido principalmente através do ciclo econômico da borracha, entre 1880 e 1912, que atraiu milhares de nordestinos, que após o declínio da borracha retornaram às terras de origem ou foram atraídos para o ciclo do café na região sudeste do Brasil. Outros ciclos posteriores, que também implicaram mobilidades sociais, como a construção de rodovias (1960-70), a mineração do ouro (1970-80) e a exploração de madeiras

(1980-90) teriam contribuído para a expansão. Atualmente, há registro de casos da doença em todos os estados da Federação (BRASIL, 2010).

2.2- O Gênero *Leishmania* Ross, 1903

Os parasitos do gênero *Leishmania* são flagelados da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, filo Protozoa. Esta ordem caracteriza-se por apresentar mitocôndria única (denominada cinetoplasto) rica em DNA mitocondrial, o kDNA. Esta organela localiza-se anteriormente ao cinetossoma do flagelo, perpendicularmente ao eixo maior do organismo (SIMPSON, 1987).

Multiplica-se por divisão binária e clonal; e a diversidade biológica encontrada no gênero ocorre devido a mutações e/ ou trocas genéticas entre organismos, através de fusão celular (SOUZA et al., 1997) e de parasitos híbridos (DELGADO et al., 1997; JAMJOOM et al., 2004; SCHWENKENBECHER et al., 2004). Há também evidências de reprodução sexual no interior do vetor e transmissão de parasitos híbridos para o mamífero hospedeiro (AKOPYANTS et al., 2009). Embora haja evidências desse tipo de reprodução, não se sabe com qual frequência ela ocorre (CUPOLLILO et al., 1994; 1998; TIBAYRENC et al., 1990; BAÑULS et al., 1999).

São parasitos digenéticos, com duas formas principais de desenvolvimento: a forma amastigota (3-7 μ m), oval, com flagelo curto interiorizado, encontrada no hospedeiro vertebrado, incluindo uma variedade de mamíferos (roedores, canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados e primatas); e a promastigota (10-20 μ m), alongada, com cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo livre a partir da porção anterior da célula, encontrada no inseto vetor (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) [LAINSON; SHAW, 2005; LAINSON, 2010].

No vetor, as promastigotas passam por alterações 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., 1989; ROJAS et al., 1995; WILSON et al., 2010). Neste processo conhecido como metaciclogênese, a forma promastigota procíclica sofre modificações como alongamento na estrutura do lipofosfoglicano (LPG) e maior expressão das moléculas de gp63 (glicoproteína de superfície de 63kDa), transformando-se então na forma metacíclica. Quando no hospedeiro vertebrado, a expressão destas moléculas permite que o parasito sobreviva, pois sua superfície é preparada para exposição ao complemento (MCCONVILLE et al., 1992; SACKS 1989; CUNNINGHAM, 2002).

2.3- Ciclo biológico e resposta imune

O ciclo biológico da *Leishmania* tem início quando as fêmeas dos fletobomíneos parasitados inoculam formas promastigotas em um hospedeiro vertebrado suscetível durante o repasto sanguíneo. Após a inoculação na pele, a maioria é destruída pela ação lítica do complemento (promastigotas procíclicas). Entretanto, as formas promastigotas metacíclicas, são resistentes à ação lítica do mesmo, pois moléculas de glicoconjugados (LPG) e glicoproteínas (gp63) favorecem a fixação de componentes C3b e iC3b que se depositam na membrana do parasito e passam a atuar como ligantes dos receptores CR1 e CR2 respectivamente, facilitando sua interiorização pelos macrófagos. Os parasitos internalizados são capazes de resistir ao ataque de metabólitos tóxicos de oxigênio, como o óxido nítrico (NO), ânion óxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A inibição da produção de radicais oxidativos do macrófago é considerada um dos principais mecanismos de evasão do parasito (SACKS; SHER, 2002; ZAMBRANO-VILLA et al., 2002).

Os parasitos vivem preferencialmente em fagócitos mononucleares (macrófagos), tendo algumas exceções fibroblastos, células dendríticas (DC) e neutrófilos (MURRAY et al., 2005; TRIPATHI et al., 2007; DE TREZ et al., 2009; KAYE; SCOTT, 2011).

Estudos demonstram que a entrada e sobrevivência de *Leishmania* (*Leishmania*) *major* em macrófagos só são possíveis com a prévia infecção de neutrófilos que são recrutados como uma resposta à picada do vetor. Dados obtidos *in vitro* mostraram que os macrófagos podem fagocitar neutrófilos apoptóticos contendo o parasito intacto, proporcionando o modo silencioso de infecção “Cavalo de Tróia” (ZANDBERGEN et al., 2004; LASKAY et al., 2008; CHARMOY et al., 2010).

Segundo Zandbergen et al. (2004), este modo de entrada silencioso ocorre por dois motivos: primeiro porque os parasitos intracelulares não têm direta interação com receptores de superfície do macrófago e conseqüentemente, a ativação do macrófago não ocorre; e segundo porque a captação de células apoptóticas “silenciam” o macrófago e seus mecanismos efetores não são ativados contra o parasito intracelular. No entanto, a cooperação entre neutrófilos e macrófagos para eliminação do parasito foi observada em estudos com *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) donovani* (MCFARLANE et al., 2008; NOVAIS et al., 2009; MALAFAIA; REZENDE, 2009; CARMO et al., 2010).

Após a fagocitose, o parasito transforma-se em amastigota dentro do vacúolo parasitóforo (fagossomo), inicialmente formado pela invaginação da membrana plasmática; este se funde com grânulos lisossomais para formar os fagolisossomos, onde as formas amastigotas deverão se multiplicar por fissão binária (HANDMAN; MCCONVILLE, 2007). Após a fusão, o parasito produz em sua superfície fosfatases ácidas que inibem a explosão oxidativa e em adição, os macrófagos tentam degradar os parasitos com enzimas ácidas. A *Leishmania* resiste ao ataque através de bomba de prótons presente em sua superfície que

permite que o pH interno permaneça próximo ao neutro. Além disso, o LPG tem um papel ativo na inibição de enzimas lisossomais. (ZILBERSTEIN; DWYERT, 1988; SHARMA; SINGH, 2009).

Os amastigotas são liberados dos macrófagos por um mecanismo ainda não totalmente caracterizado (RITTING; BOGDAN, 2000; HANDMAN; MCCONVILLE, 2007) e podem invadir células dendríticas, fibroblastos e novos macrófagos (AWASTHI et al., 2004). Durante um novo repasto sanguíneo, o flebotomíneo ingere os macrófagos infectados com a forma amastigota. No período de quatro a cinco dias no intestino do inseto vetor, as formas amastigotas de *Leishmania* diferenciam-se na forma promastigota procíclica que posteriormente passam pelo processo de metaciclogênese. Os promastigotas metacíclicos migram então para a região anterior do tubo digestivo do vetor atingindo o aparelho picador sugador, a partir do qual podem ser transmitidos (WALTERS et al., 1989; ROJAS et al., 1995; WILSON et al., 2010) [Figura 01].

A infecção por *Leishmania* é acompanhada por complexa resposta imune que inicia com a resposta inata, onde receptores como TLR2 (Toll-like receptor 2) presentes em macrófagos, as células NK (Natural Killer) e células dendríticas reconhecem moléculas presentes na superfície de parasitos, tais como LPG e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-12, bem como moléculas co-estimulatórias (BECKER et al., 2003; CARRADA et al., 2007; RUIZ; BECKER, 2007).

Os macrófagos desempenham um papel triplo uma vez que são células hospedeiras, células apresentadoras de antígenos e ativam células T específicas, cuja eficácia leishmanicida depende da ativação de citocinas como IFN- γ e TNF- α (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1999; RUIZ; BECKER, 2007). Considerando que a forma amastigota é capaz de superar os mecanismos microbicidas do macrófago, a sua sobrevivência dependerá então da capacidade

de resistir, também, aos mecanismos da resposta imune celular (ZILBERSTEIN; DWYERT, 1988; SHARMA; SINGH, 2009).

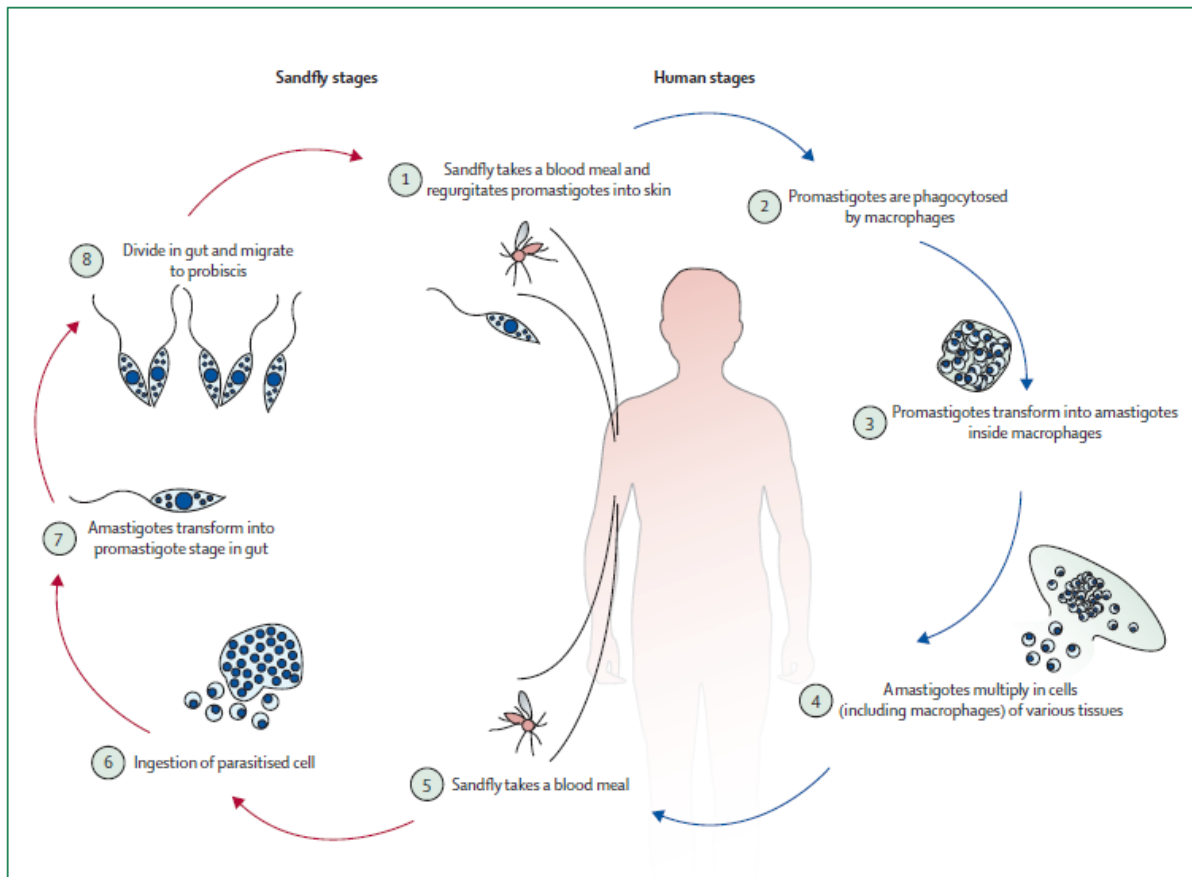


Figura 01. Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento de parasitos do gênero *Leishmania*. Fonte: REITHINGER et al. (2007).

A célula de Langerhans na pele também pode ser infectada por *Leishmania* e é considerada a principal apresentadora de antígenos parasitários para linfócitos T. Quando infectadas, são ativadas e passam a ter a expressão aumentada de MHC I e II, moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 e CD86 e citocinas (BANCHEREAU et al., 2000; ZULUAGA; ROBLEDO, 2004), porém com diminuição de expressão de E-caderina, molécula de superfície relacionada com a ligação das células de Langerhans aos

queratinócitos da epiderme. Esses eventos permitem que as células parasitadas não fiquem aderidas ao tecido epidérmico e migrem para os linfonodos regionais, a fim de realizar a apresentação dos antígenos de *Leishmania* às células efetoras do sistema imune (MOLL, 1993; CASTELLANO, 2005), resultando na estimulação diferencial das subpopulações dos linfócitos T CD4, Th1 e Th2, cujas citocinas irão regular positivamente: Th1 (IL-2, INF- γ e TNF- α) ou negativamente: Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF- β) a atividade do macrófago na eliminação do parasito (ZULUAGA; ROBLEDO, 2004).

A ativação do macrófago, através da resposta imune Th1, resulta na produção do óxido nítrico (NO), que juntamente com o stress oxidativo representa importante mecanismo de eliminação do parasito (PIRMEZ et al., 1993; BACELLAR et al., 2002). Por outro lado, as citocinas consideradas tipo Th2, favorecem a multiplicação do parasito, inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- γ , além de promoverem a exacerbação das lesões, em razão das ações supressivas dos macrófagos pela IL-4 (ROBERTS et al., 2001; BITTAR et al., 2007; GOMES-SILVA et al., 2007; BRELAZ-DE CASTRO et al., 2012).

Há evidências de que as células T CD8 também são necessárias para o controle da leishmaniose através da produção de citocinas e de mecanismos citotóxicos, incluindo granzima/perforina e Fas/Fas ligantes. Grande número de células tem sido observado em lesões e em sangue periférico durante a fase aguda da infecção (DA-CRUZ et al., 1994; COUTINHO et al., 1998; BERTHO et al., 2000; RUIZ; BECKER., 2007). Faria et al. (2009) observaram que lesões de pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* em progressão para fase ulcerada apresentam intenso infiltrado inflamatório amplificado pela presença de células T CD8 expressando granzima A, bem como IFN- γ ; células TCD8 são consideradas vitais na produção de IFN- γ em leishmaniose (RUIZ; BECKER., 2007).

Em outro estudo, lesões de pacientes com LC infectados por *L. (V.) braziliensis* apresentaram maior número de linfócitos TCD8 em apoptose que lesões de pacientes curados

espontaneamente, estando a apoptose provavelmente relacionada à modulação da resposta imune (BERTHO et al., 2000). A degradação apoptótica de *Leishmania* pode não só ter o papel de controlar o número de parasitos, mas também representa a única oportunidade de aprimorar o processamento e apresentação de antígenos, uma vez que parasitos vivos causam inibição da degradação e apresentação antigênica eficazes pela célula hospedeira (RUIZ; BECKER, 2007).

Estudos prévios demonstraram haver uma predominância de linfócitos T CD4 sobre T CD8 no sangue durante a fase ativa da leishmaniose. Entretanto, após terapia com antimonial pentavalente, há redução dos linfócitos T CD4 e aumento de T CD8, sugerindo o envolvimento destes com o processo de cura (DA-CRUZ et al., 1994; 2002; 2005; TOLEDO et al., 2001; CASTRO, 2011; ALMEIDA et al., 2011; BRELAZ-DE CASTRO, et al., 2012). Estes linfócitos são recrutados do sangue para dentro do infiltrado inflamatório, onde a frequência de células T é maior (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 1990; DA-CRUZ et al., 2005).

As células T CD4 também podem se diferenciar em células efectoras Th17 que produzem, entre outras citocinas, a interleucina 17 (IL-17) que desempenha papel fundamental em processo inflamatório, em doenças autoimunes e câncer (KOLLS; LINDÉN, 2004; KOSTKA et al., 2009; LEE et al., 2009).

Pouco se sabe a respeito desta citocina em infecções por protozoários, entretanto, Bacellar et al. (2009) observaram que IL-17 é produzida durante infecção por *L. (V.) braziliensis*. Linfócitos obtidos de pacientes com LM e LC, produziram níveis mais elevados de IL-17 que linfócitos obtidos a partir de indivíduos controles (não infectados). Houve uma tendência para o tecido obtido a partir de pacientes com a forma mucosa em conter maior número de células que expressam IL-17 em comparação com os tecidos obtidos de pacientes com a forma cutânea, e havia correlação direta entre o número de células que expressam IL-

17 e a presença de inflamação celular no local da lesão, confirmando assim o papel desta interleucina na patogênese da reação inflamatória na leishmaniose.

As subpopulações dos linfócitos T CD4, Th1 e Th2, também induzem a síntese de anticorpos de diferentes isotipos através da estimulação policlonal de células B. No entanto, o papel dos títulos de anticorpos na resolução da Leishmaniose cutânea é pouco conhecido (OZBILGE et al., 2006). Sabe-se que pacientes com quadros clínicos causados por diferentes espécies de *Leishmania* no Brasil mostram diferenças significativas na intensidade da produção de anticorpos (ROMERO et al., 2005; MATTA et al., 2009).

A intensidade da resposta humoral parece também estar relacionada com a carga parasitária e com a cronicidade da infecção. Pacientes com maior tempo de evolução da doença apresentam altos níveis de IgE e em pacientes com a forma mucocutânea, os níveis de IgA se mostram aumentados (O'NEIL et al., 1993). Correlação positiva entre os níveis de IgE com o tamanho da intradermorreação e uma correlação inversa entre os níveis de IgE com o número de lesões foram observados por Sousa-Atta et al. (2002).

Ozbilge et al. (2006), demonstraram haver níveis elevados de IgG, com predomínio de IgG1 e IgG3, em pacientes com leishmaniose cutânea ativa. No entanto, outros estudos mostraram que após cura clínica e tratamento com antimonial, o nível dessas subclasses decresce (CASTELLANO et al., 2009; FAGUNDES-SILVA et al., 2012), sugerindo que estas subclasses poderiam ser úteis tanto como marcadores de diagnóstico para a forma cutânea quanto para auxiliar na decisão de interrupção do acompanhamento ambulatorial de pacientes após cura clínica.

Podem ser observados altos títulos de anticorpos em todas as manifestações clínicas da LTA (TRUJILLO et al., 1999; OZBILGE et al., 2006). No entanto, MATTA et al. (2005; 2009) verificaram variação quanto à resposta imune humoral em pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, demonstrando pela técnica imunoblot ser mais baixo e

de menor frequência, o reconhecimento das frações antigênicas em soros de *L. (V.) guyanensis* do que de *L. (V.) braziliensis*. Também verificaram, pela reação de imunofluorescência, menor reatividade de IgG em soros de paciente com *L. (V.) guyanensis*, sugerindo uma resposta imune humoral menos efetiva em pacientes infectados por esta espécie do que com *L. (V.) braziliensis*; o que poderia explicar alguns aspectos peculiares da apresentação clínica da LTA cutânea ocasionada por *L. (V.) guyanensis*, como maior número de parasitos nas lesões e maior resistência ao tratamento. Enquanto a infecção por *L. (V.) braziliensis* parece ser mais agressiva, apresentando áreas ulceradas maiores e maior proporção de pacientes com linfonodomegalia (ROMERO et al., 2001a).

ROMERO et al. (2005) demonstraram uma maior sensibilidade do teste de ELISA para detecção de anticorpos em pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* do que a reação de imunofluorescência, principalmente para infecções por *L. (V.) guyanensis* que induzem a uma baixa resposta humoral.

Mota (2007) analisou comparativamente valores obtidos da densidade ótica dos isotipos IgM e IgG de 33 pacientes com *L. (V.) guyanensis*, independente da idade, sexo ou fase clínica, sugerindo que pelos baixos níveis de anticorpos existam evidências de que a modulação da resposta imune ocorra em pacientes infectados por esta espécie durante a progressão da doença, corroborando com informações da literatura (ROMERO et al., 2005; MATTA, 2009).

Diversos autores têm demonstrado que no tratamento para as leishmanioses cutâneas ocorre a cura clínica com a cicatrização das lesões, o que não coincide com a cura parasitológica, pois o parasito pode continuar quiescente nas cicatrizes (SCHUBACH et al., 1998 a e b; COUTINHO et al., 2002; MENDONÇA et al., 2004; VERGEL et al., 2006; VIANA et al., 2013). Essa persistência parasitária pode ser importante para manutenção de células T de memória que conferem resistência à reinfecção, principalmente para pacientes

residentes em áreas endêmicas. Por outro lado, há possibilidade de que pacientes curados clinicamente possam atuar como reservatórios do parasito em áreas de transmissão ativa (MENDONÇA et al., 2004; ZAPH et al., 2004; GOLLOB et al., 2005; SCOTT, 2005).

Zaph et al. (2004) demonstraram em murinos, que a resposta de células T se subdivide em populações de memória central (TCM) e memória efetora (TEM). As TCM não exigem a presença constante de parasitos vivos para a sua manutenção, enquanto o *pool* de TEM depende. Porém, ainda não está claro o papel dos antígenos residuais na conservação das TCM.

Recentes estudos indicam que a produção de IL-10 por células T CD4 CD25 (Treg) está relacionada com a persistência da *Leishmania* e reativação da doença (MENDEZ et al., 2004; BITTAR et al., 2007). Estudos com camundongos *knock-out* para IL-10 infectados com baixa dose de parasitos desenvolveram resposta imune aumentada e eliminação total dos parasitos. Esses camundongos perderam a imunidade à reinfecção, sugerindo, portanto, que a persistência parasitária é necessária para manter a imunidade (BELKAID et al., 2001; 2002; VON STEBUT, 2007; KAYE; SCOTT, 2011). A secreção de IL-10 por células Th1, portanto, é um mecanismo autorregulatório que minimiza a imunopatologia na LTA (NYLÉN; GAUTAM, 2010; CASTRO, 2011).

Quando ocorre o desequilíbrio parasito/hospedeiro, cria-se então o risco de reativação da doença, produzindo recidivas e o desenvolvimento da forma mucosa, anos ou meses após a cicatrização da lesão (BELKAID et al., 2001; SCHUBACH et al., 2001). Atualmente, não existe nenhuma maneira de prever em quem esta forma mais grave da doença se desenvolverá (SCOTT, 2011).

Em estudo recente, Ives et al. (2011), mostraram que cepas metastáticas de *L. (V.) guyanensis* (WHI/BR/78/M5313) contêm um vírus RNA, denominado LRV1, que promove a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- α , CXCL10 e CCL5. A resposta ao

vírus é mediada pelo produto do gene TLR 3 (TLR3), um receptor de RNA que é expresso dentro do compartimento endossomal onde os parasitos se encontram. A hipótese é de que o RNA viral é liberado por parasitos mortos logo após a infecção; a ligação do RNA viral ao TLR3 resulta na produção de citocinas e quimiocinas que aumentam a resposta inflamatória, exacerbando a doença. Uma elevada carga infectante de LRV1 em parasitos poderia ser um determinante para a gravidade e patologia da doença (ZANGGER et al., 2013).

2.4- Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar

O diagnóstico clínico da doença baseia-se em lesões cutâneas, as quais são similares nas várias formas de leishmanioses tegumentares. O período de incubação da doença varia de uma a quatro semanas, surgindo então uma lesão inicial, constituída por pápula eritematosa única ou múltipla, localizada geralmente em região descoberta do tegumento, que corresponde ao ponto de inoculação pelo flebotomíneo. Nesta etapa, pode-se ainda encontrar linfangite e adenopatia regional. As lesões evoluem formando úlceras, as quais apresentam bordos altos, irregulares e infiltrados (aspecto em moldura de quadro), com fundo granuloso, de coloração vermelho-vivo, podendo estar coberta por exsudado seroso ou sero-purulento. No mesmo doente é possível encontrar lesões com diferentes fases evolutivas, eventualmente sendo observada satelirose, que são as lesões satélites da leishmaniose (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

A lesão pode evoluir para cicatrização espontânea deixando uma hipopigmentação, cicatriz lisa e fina (SAMPAIO; RIVITTI, 2001; GOTO; LINDOSO, 2010), ou para diferentes formas de lesões, sendo possível encontrar formas impetigóide, liquenóide, tuberculosa ou lupóide, nodular, vegetante e ectimatóide. São frequentes as ulcerações com bordas elevadas, endurecidas e fundo com tecido de granulação grosseira, configurando a clássica lesão com borda em moldura (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A forma cutânea localizada é a mais prevalente na LTA e as lesões variam em número de um a dez. Pode curar-se espontaneamente ou dependendo do equilíbrio parasito-hospedeiro e outros fatores não definidos, alguns casos podem evoluir para outras formas da doença.

As lesões mucosas são na maioria das vezes secundárias as lesões cutâneas, podendo surgir depois de meses ou anos, sendo ocasionadas pela disseminação hematogênica da doença e acometem principalmente cavidades nasais, seguidas de faringe, laringe e cavidade oral. Normalmente há um discreto eritema e infiltração do septo nasal, seguindo-se um processo ulcerativo que acomete a mucosa das faces laterais das asas do nariz e elementos contíguos. Ocorre destruição do septo nasal, o nariz tomba para frente constituindo o chamado nariz de anta ou tapir. O quadro geralmente envolve os lábios superior e inferior, palato, gengivas e língua. Na cavidade oral, especialmente no palato, as lesões são úlcero-vegetantes com granulações grosseiras, às vezes separadas por sulcos. As queixas mais comuns de sintomas são: epistaxe, rinorréia, crostas (pelo acometimento nasal), odinofagia (faringe), rouquidão, tosse (laringe) e feridas na boca (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

A forma mucosa pode ser ocasionada principalmente pelas espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* e está associada à hipersensibilidade de células T, com grande expressão de IFN- γ e TNF- α e são escassos os parasitos nas lesões (NAIFF et al., 1988; GRIMALDI et al., 1991, NAIFF,1998; SILVEIRA et al., 2004; 2008; GUERRA et al., 2011; GUIZANI et al., 2011).

Segundo Guerra et al. (2011), a associação entre a forma cutânea tratada indequadamente e a ocorrência da forma mucosa, parece ser mantida tanto para *L. (V.) guyanensis* quanto para *L. (V.) braziliensis*. Na Região Amazônica, é comum a falta de acesso ao diagnóstico e tratamento da leishmaniose. O isolamento das comunidades com acesso quase que exclusivamente por barcos em muitas áreas e a falta de recursos financeiros para

permanecer em Manaus e garantir tratamento adequado, podem estar associados com o desenvolvimento da forma mucosa.

A Leishmaniose cutânea difusa (LCD) é a forma anérgica da LTA. As lesões são ricas em parasitos e a espécie envolvida é a *L. (L.) amazonensis*. Inicia de maneira insidiosa, evoluindo de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões do tegumento cutâneo do corpo. Há grande produção de IL-4, resultando numa fraca ou ausente resposta imune celular. A resposta à terapêutica é pobre ou ausente (COSTA et al., 2009; SILVEIRA et al., 2004; 2008; 2009).

A forma disseminada é caracterizada pela presença de múltiplas lesões (10-300) pleomórficas, principalmente acneiforme e papular, em duas ou mais áreas não contíguas do corpo. O comprometimento mucoso tem sido observado em até 30% dos casos. São duas as espécies conhecidas como causadoras desta forma de LTA: *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Mais recentemente foi proposta a forma Leishmaniose cutânea disseminada “bordeline” (LCDB), sendo intermediária entre LCL e os polos extremos patogênicos LMC e LCAD. O termo “bordeline” foi usado para caracterizar a supressão parcial da resposta imune celular observada, havendo uma resposta CD4 mista (Th1 e Th2). Embora respondam ao tratamento, os pacientes normalmente requerem uma ou mais séries de antimonial para alcançarem a cura clínica (COSTA et al., 2009; SILVEIRA et al., 2004; 2008; 2009).

Na forma cutânea da LTA, o critério de cura é definido pelo aspecto clínico das lesões, reepitelização das lesões ulceradas ou não ulceradas, regressão total da infiltração e eritema até três meses após a conclusão do esquema terapêutico. Na forma mucosa, o controle é definido pela regressão de todos os sinais clínicos ao exame otorrinolaringológico, até seis meses após a conclusão do tratamento (BRASIL, 2007; FAGUNDES-SILVA et al., 2012). Após a cura clínica é indicado o acompanhamento do paciente até completar 12 meses após o tratamento (BRASIL, 2007).

2.5- Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico parasitológico da LTA baseia-se na detecção do parasito em tecido cutâneo, sendo de fundamental importância devido às doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LTA (SCHUBACH et al., 2001; GUEDES et al., 2008). As formas cutâneas devem ser diferenciadas das úlceras traumáticas, úlceras de estase, úlcera tropical, úlceras de membros inferiores por anemia falciforme, piodermites, paracoccidiodomicose, neoplasias cutâneas, sífilis e tuberculose cutânea. A probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A demonstração de *Leishmania* é feita em lâminas coradas por Giemsa, Leishman ou Panótico, em amostras obtidas por diferentes métodos: escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa (na investigação de comprometimento ganglionar primário). Outros métodos utilizados são: isolamento em cultivo *in vitro*, sendo o método de confirmação do agente etiológico que permite a posterior identificação da espécie de *Leishmania* envolvida; e a inoculação em animais de laboratório, que é reservado às pesquisas (BRITO et al., 2000; BRASIL, 2000; 2007).

A intradermoreação de Montenegro (IDRM), Imunofluorescência indireta (IFI) ou teste imunoenzimático (ELISA) são testes imunológicos que também podem ser utilizados como auxiliares do diagnóstico da LTA (SILVEIRA et al., 1999; BRASIL, 2006).

A IDRM é um teste de hipersensibilidade tardia que revela infecção por *Leishmania*, sendo por isso utilizado em estudos epidemiológicos demonstrando a prevalência da infecção (FREIRE JOSÉ et al., 2001). Na prática, juntamente à pesquisa direta do parasito em tecidos, o teste de Montenegro é a melhor forma de confirmar o diagnóstico (SCHUBACH et al., 2005; ROCHA et al., 2006), entretanto pode haver reação cruzada com outras patologias ou

mesmo hipersensibilidade ao conservante (timerosal) (ROMERO et al., 2005; COSTA et al., 2009). O teste não faz distinção entre infecção passada e presente (JUNQUEIRA-PEDRAS et al., 2003) e é comum ser positivo devido à ocorrência de infecções subclínicas (VEGA-LÓPEZ, 2003), portanto, sua importância como teste diagnóstico é questionável para pessoas que vivem em áreas endêmicas (GOTO; LINDOSO, 2010); e sabe-se que repetidas aplicações do próprio IDRM também podem induzir uma imunossensibilização capaz de conferir positividade ao mesmo (BRASIL, 2010).

Pacientes com a forma cutânea difusa apresentam negatividade ao teste (SILVEIRA et al., 2004; COSTA et al., 2005; BARRAL; BARRAL-NETTO, 2009), assim como pacientes com lesões recentes; e nos casos da forma cutânea localizada por *L. (L.) amazonensis*, cerca de 50% dos casos apresentam-se negativos (MORAES; SILVEIRA, 1994; SILVEIRA et al., 2008; BRASIL, 2010). Para o teste de Montenegro, a espécie de *Leishmania* e o preparo do antígeno variam em diferentes países e laboratórios. Apresenta uma alta sensibilidade e uma especificidade que varia de acordo com o antígeno utilizado. O resultado do teste é considerado positivo quando o endurecimento local é de 5mm ou mais, após 48-72 horas (ROMERO et al., 2005; GOTO; LINDOSO, 2010).

Testes sorológicos são de grande importância para casos onde há dificuldade da demonstração do parasito (BRASIL, 2010). O diagnóstico de rotina é geralmente combinando os aspectos clínicos e epidemiológicos com os métodos imunológicos (SILVEIRA et al., 1999; PISSINATE et al., 2008). Os métodos convencionais utilizados são a Imunofluorescência indireta (IFI), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e Western blot. São baseados na presença de anticorpos específicos contra antígenos parasitários (BRITO et al., 2000; 2001; GONÇALVES et al., 2002).

Estes métodos apresentam algumas limitações como não correlacionar os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença, não distinguindo infecção em curso dos casos

de infecção passada ou a infecção ativa dos casos onde houve desenvolvimento de infecção subclínica e podem apresentar reações cruzadas com outros tripanosomatídeos. Vários autores procuram superar as limitações destas técnicas e o principal desafio tem sido a busca de um preparo do antígeno ideal para pesquisa de anticorpos anti *Leishmania*. Alguns sugerem que a utilização de antígenos espécie-específicos leva a uma melhor detecção de anticorpos (RYAN et al., 2002; ROCHA et al., 2002; 2006; GOMES-SILVA et al., 2008; BARROSO-FREITAS et al., 2009), enquanto outros afirmam que a utilização de antígenos heterólogos de *Leishmania* não reduz a eficácia das técnicas (JUNQUEIRA-PEDRAS et al., 2003). Estes métodos não são indicados como critério isolado de cura ou de previsão de recorrência. Nesses casos, a presença ou ausência de lesões tegumentares em atividade é o critério decisivo (BRASIL, 2010).

Atualmente as técnicas sorológicas têm aumentado a sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos utilizados para LTA, particularmente para a forma cutânea; como a citometria de fluxo que vem sendo amplamente utilizada com diferentes metodologias e permite detectar anticorpos anti-*Leishmania* (JUNQUEIRA-PEDRAS et al., 2003; GOMES-SILVA et al., 2008; PISSINATE et al., 2008; FAGUNDES-SILVA et al., 2012), discriminando a forma cutânea localizada, da leishmaniose visceral e doença de Chagas (ROCHA et al., 2006).

Técnicas de diagnóstico molecular baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido utilizadas para fins de pesquisa e juntamente ao diagnóstico parasitológico em LTA (RODRIGUES et al., 2002; BENSOUSSAN et al., 2006; ALVAREZ et al., 2010; MARTINS et al., 2010; JARA et al., 2013). Com alta sensibilidade e especificidade, são particularmente úteis em amostras contendo poucos parasitos, como na forma mucosa. Mas, seu uso rotineiro é ainda impedido por demandar uma infraestrutura laboratorial adequada, pessoal qualificado e alto custo (REITHINGER, 2007).

2.6- Tratamento

O tratamento da LC é recomendado para acelerar o processo de cura e evitar casos de persistência ou disseminação do parasito que poderiam causar formas mais graves como a mucosa, assim como reduzir a formação de cicatrizes ou recaídas (REITHINGER et al., 2007).

As drogas comumente utilizadas no tratamento para LTA são antimoniais pentavalentes (primeira escolha) e anfotericina B e pentamidina (segunda escolha). A descrição destes tratamentos e outras drogas alternativas serão feitas a seguir.

2.6.1- Antimonial pentavalente

O antimonial trivalente (Sb III), tártaro emético, foi introduzido no Brasil por Gaspar Vianna em 1912. Sob a forma de antimoniais pentavalentes (SbV), são as drogas de escolha desde 1945 para o tratamento das leishmanioses. Há comercialmente o antimoniato de N-metilglucamina (NMG) (Glucantime®), na America Latina e África, e o estibogluconato de sódio (SGS) (Pentostam®), nos Estados Unidos e Europa (LIMA et al., 2007; JEDDI et al., 2011).

O mecanismo de ação do antimonial ainda não é totalmente conhecido, provavelmente devido à inibição de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) através da inibição do ciclo do ácido cítrico e da glicólise, e à ativação e conversão do antimonial pentavalente (SbV) para a forma trivalente (SbIII), o que leva à definição de SbV como pró-fármaco. Essa conversão ocorre tanto no macrófago quanto na amastigota. Pare ser ativo contra a *Leishmania*, é necessário que o antimonial entre na célula hospedeira, atravesse

a membrana do fagolisossomo e aja contra a amastigota (BROCHU et al., 2003; OUELLETTE et al., 2004).

Há possibilidade de que mais de um mecanismo seja responsável pela ativação da droga (enzimático ou não enzimático). O Sb é capaz de alterar o potencial redox tiol da célula induzindo o efluxo de tiol intracelular e inibindo a tripanotona redutase (OUELLETTE et al., 2004). Uma enzima específica do parasito, TDR1 (redutase dependente de tiol 1), pode catalisar a conversão de SbV para Sb III usando glutatona como redutor (DENTON et al., 2004). A enzima antimônio redutase, ACR2 (arsenato redutase 2), também reduz o SbV e aumenta a sensibilidade ao mesmo. O tiol, incluindo tiol parasito-específico como glicilcisteína, pode reduzir SbV para Sb III de forma não enzimática (SANTOS FERREIRA et al., 2003). Ambos, SbIII e SbV medeiam a fragmentação do DNA nas leishmânias e transporte de fosfatidilserina para o lado externo da membrana celular, sugerindo que o Sb aja como mecanismo da apoptose (SERENO et al., 2001; LEE et al., 2002; SUDHANDIRAN; SHAHA, 2003).

Acredita-se que a ação do antimônio possa destruir o parasito por mecanismos diretos e indiretos, com a ajuda da resposta imune do hospedeiro, sendo dependente de citocinas e subtipos de células T (KOFF et al., 1994; MURRAY, 2001; SUDHANDIRAN ; SHAHA, 2003; LIMA et al., 2007). Entretanto, já foi descrito que alguns conservantes da droga, como o m-clorocresol, apresentam ação leishmanicida (ROBERTS; RAINEY, 1993).

Muniz-Junqueira e Paula-Coelho (2008), demonstraram o aumento da produção *in vitro* do TNF- α na presença de Glucantime® e, conseqüentemente, da expressão de óxido nítrico. Além disso, houve aumento da função fagocitária de monócitos e neutrófilos em indivíduos saudáveis através do sistema Complemento, provavelmente relacionados à possível habilidade do antimonial em aumentar a expressão de receptores para o sistema Complemento na membrana dos fagócitos. Souza et al. (2010), relacionaram a resistência de

cepas de *Leishmania* ao óxido nítrico à não responsividade da LTA ao antimonial e conseqüentemente à ativação diminuída de macrófagos e produção de TNF- α . Cepas de *L. (V.) braziliensis* de pacientes refratários (tratados com mais de três ciclos de antimonial) foram mais resistentes ao óxido nítrico *in vitro* que cepas de pacientes responsivos. Giudice et al. (2007), observaram que a resistência de cepas de *Leishmania* ao óxido nítrico confere benefício à sobrevivência dos parasitos no interior dos macrófagos e possivelmente agrava o curso clínico da LTA e, além disso, pacientes infectados com cepas de *L. (V.) braziliensis* resistentes apresentavam lesões cutâneas maiores que pacientes infectados com cepas não resistentes.

Estudos utilizando antígenos solúveis (formados por proteínas do citoplasma do parasito) e insolúveis (constituído de fragmentos de membrana) de *L. (V.) braziliensis* detectaram diferentes respostas celulares frente ao tratamento com antimonial. Reis et al. (2009), utilizando antígenos solúveis de *L. (V.) braziliensis*, concluíram que há resposta proliferativa e produção de IL-10 e IFN- γ específicas antes e após tratamento quimioterápico, havendo aumento na produção de IL-10 e diminuição de IFN- γ após terapia. Souza et al., (2012), também observaram depleção de IFN- γ após tratamento, mas aumento da produção de TNF- α e NO, utilizando antígeno solúvel. No entanto, Brelaz-de-Castro (2012), detectaram aumento da produção de IFN- γ e TNF- α , sendo este último, só quando estimulado com a fração antigênica solúvel, sendo que pacientes com cura espontânea apresentaram o mesmo perfil. Houve também maior expressão de linfócitos TCD8, citocinas do tipo 1, assim como de CD25 e IL 10, sugerindo mecanismos regulatórios.

Outros autores também observaram uma maior produção de IFN- γ após terapia utilizando antígeno total obtido a partir de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (TOLEDO et al., 2001; DA CRUZ et al., 2002; TELINO et al., 2005).

Em estudos realizados por Brito et al. (2000; 2001), utilizando antígenos solúveis de *L. (V.) braziliensis*, os autores observaram diminuição da reatividade de anticorpos IgG a antígenos de 27 e 30 kDa em soro de pacientes após cura clínica com antimoniais. A frequência destes antígenos diminuiu cerca de duas vezes em pacientes clinicamente curados, sugerindo que eles poderiam ser úteis como marcadores de cura da LTA. Perfil similar de resposta humoral também foi observado em pacientes curados espontaneamente.

Estudos utilizando diferentes antígenos de *Leishmania* demonstram que estes são capazes de induzir diversos níveis de resposta imune, podendo ser responsáveis pelas diferenças observadas nos resultados de vários trabalhos (TOLEDO et al., 2001; DA CRUZ et al., 2002; TELINO et al., 2005; BRELAZ-DE CASTRO et al., 2012). Acredita-se, por exemplo, que o antígeno insolúvel é mais imunogênico que o antígeno solúvel (TELINO et al., 2005). Enquanto o antígeno total não passa por processos diferenciados de centrifugação para separação de componentes de membrana e citoplasmáticos, sugerindo-se que sua imunogenicidade advém de porções da membrana do parasito no preparo do antígeno (SOUZA, 2010).

Outros fatores também podem influenciar nos resultados de trabalhos envolvendo resposta imune, como diferenças no tempo após tratamento em que os indivíduos foram monitorados, material biológico utilizado, espécie e cepa do parasito e diferenças genéticas entre os indivíduos (DA CRUZ et al., 1996; 2002; KOCYIGIT et al., 2002; LEOPOLDO et al., 2006; BITTAR et al., 2007; CASTELLANO et al., 2009; REIS et al., 2009; KÜCKELHAUS et al., 2011; SALDANHA et al., 2012).

Viana et al. (2013), analisando aspectos histopatológicos e imunológicos de lesões de pacientes com LTA, antes e depois do tratamento com Glucantime, Glucantime + Leishvacin e Glucantime + Leishvacin associado com Bacilo Calmette-Guerin, observaram que a expressão de IFN- γ IL-12, IL-4 e IL-10 foi menor após todos os tratamentos. Antes do

tratamento observaram aumento da expressão de citocinas Th1 e após tratamento houve redução na resposta inflamatória e mistura de respostas Th1 e Th2.

Saldanha et al. (2012), observaram aumento da atividade fagocitária de monócitos em indivíduos tratados com antimonial, assim como na produção de TNF- α . Não houve influência do medicamento na produção de IL-10 e IFN- γ . Almeida et al. (2011), detectaram aumento no número de células T CD8 citotóxicas em sangue periférico de pacientes com LTA após tratamento com antimonial; assim como de células T CD25, sugerindo a participação destas na modulação de uma resposta efetora exacerbada.

A resposta do paciente ao tratamento com antimonial pode variar de acordo com a espécie e cepa do parasito, o estado imunológico do paciente e a forma clínica da doença (ROMERO et al., 2001b; AREVALO et al., 2007; SILVEIRA, 2009; NEVES, 2010; GUERRA et al., 2011; PIMENTEL et al., 2011). No Brasil, há uma resposta precária ao antimonial em pacientes infectados com *L. (V.) guyanensis*, espécie prevalente no estado do Amazonas (ROMERO et al., 2001b; NEVES, 2010).

O Ministério da Saúde recomenda administração endovenosa ou intramuscular, de 10 a 20mg de antimonial pentavalente/Kg por dia para a forma cutânea da doença, durante 20 dias seguidos, contraindicando doses superiores a três ampolas por dia. Nos casos onde não haja cicatrização em três meses, deve-se repetir o tratamento, prolongando-o por trinta dias (BRASIL, 2007). O esquema de tratamento para todas as formas de LTA encontra-se na tabela 01.

Tabela 01: Dose recomenda das drogas de primeira linha para o tratamento da LTA de acordo com WHO e Ministério da Saúde do Brasil.

Forma Clínica	Antimonial Pentavalente		Anfoterinina B		Pentamidina	
	OMS	Brasil	OMS	Brasil	OMS	Brasil
LCL	20mg/Kg/dia por 20 dias	10-20mg/Kg/dia (15mg/Kg/dia) por 20 dias	ND	1mg/Kg/dia Dose total: 1-1.5g	4mg/Kg/dia	4mg/Kg/dia Dose total máxima: 2g
LCD	20mg/Kg/dia por 20 dias	10-20mg/Kg/dia (15mg/Kg/dia) por 20 dias	ND	1mg/Kg/dia Dose total: 1-1.5g	ND	4mg/Kg/dia Dose total máxima: 2g
LD	20mg/Kg/dia por 20 dias	20mg/Kg/dia por 20 dias	ND	1mg/Kg/dia Dose total: 1-1.5g	ND	ND
LM	ND	10-20mg/Kg/dia por 20 dias	ND	1mg/Kg/dia Dose total: 2.5-3g	ND	4mg/Kg/dia Dose total máxima: 2g

LCL: Leishmaniose cutânea localizada; LCD: Leishmaniose cutânea disseminada; LD: Leishmaniose difusa; LM: Leishmaniose Mucosa; ND: Não determinado. Fonte: Goto; Lindoso (2010)

Os principais efeitos colaterais da droga são artralgia, mialgia, febre, dor de cabeça, vômitos e tonturas. Possui toxicidade ao coração, rins, fígado e pâncreas. Seu uso não é indicado durante a gravidez, por idosos e indivíduos que apresentem doença cardíaca, renal ou alterações hepáticas (GOTO; LINDOZO, 2010).

Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e pentamidina (BRASIL, 2010).

2.6.2- Outros tratamentos

A anfotericina B é um antibiótico poliênico que tem alta afinidade para o ergosterol, o esterol predominante em microorganismos, causando aumento da permeabilidade da

membrana celular promovendo um influxo de íons para o parasito, levando à sua morte. É administrado por via endovenosa e diferenças na sensibilidade das espécies de *Leishmania* ao tratamento podem ser esperadas devido ao tipo e quantidade de esterol nas membranas dos parasitos (CROFT et al., 2006; BRASIL, 2007; ELLIS et al., 2009; GOTO; LINDOSO, 2010). A forma lipossomal está associada a uma menor frequência dos efeitos secundários, mas seu custo elevado e a necessidade de administração por via intravenosa limitam seu uso (BRASIL, 2010).

A pentamidina é uma diamina aromática que interfere com a síntese de DNA do cinetoplasto do parasito levando-o a morte. Seus principais efeitos adversos são: hipotensão, mialgia, abscesso no local da injeção, hipoglicemia e diabetes mellitus (CROFT et al., 2006; GOTO; LINDOSO, 2010). Neves (2010), em trabalho recente, demonstrou que pentamidina tem baixa eficácia no tratamento de LTA em pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis*, assim como o SbV no Amazonas.

Existem outros tratamentos com drogas alternativas como: fluconazol, cetoconazol, itraconazol, imiquimod, paromomomicina, miltefosina, azitromicina, antibióticos tópicos, antimonial intralesional, crioterapia, termoterapia, entre outros. Todos com eficácia variável (CROFT et al., 2006; LIMA et al., 2007; GOTO; LINDOSO, 2010; NEELAGIRI et al., 2010; CHRUSCIAK-TALHARI et al., 2011).

2.7- Doença humana no estado do Amazonas

O estado do Amazonas é uma região endêmica para LTA. Em 2012, apresentou 2235 casos da doença, sendo que os municípios com maior número de casos notificados foram: Manaus com 647, Rio Preto da Eva com 258 e Presidente Figueiredo com 292 (SINAN, 2012).

A incidência de Leishmaniose no Amazonas aumentou significativamente com a abertura de novas estradas, instalação de novos núcleos residenciais onde previamente existia densa floresta tropical e com treinamento de militares na selva (TALHARI et al., 1988; GUERRA et al., 2003), em especial, na cidade de Manaus, que teve uma urbanização não planejada, com construção de vários bairros nos arredores da floresta primária. A ocupação destas áreas levou muitas pessoas ao contato com o ciclo *L. (V.) guyanensis* (DESJEUX, 2001). Neste caso, a transmissão também pode ocorrer no intra e peridomicílio, pela proximidade das residências com as áreas de floresta, além da provável adaptação do vetor a este novo ambiente (PAES et al., 1998; GUERRA et al., 2006).

Grande parte dos casos de LTA atendidos pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), em Manaus, é oriunda da rodovia AM-010, que liga a cidade de Manaus a Itacoatiara, passando pelo município de Rio Preto da Eva. Possui 180 km de extensão e diversos assentamentos agrários distribuídos ao longo de seu percurso (GUERRA et al., 2003; 2006).

O projeto de Assentamento Iporá fica localizado no Km 127 da AM 010, em sua margem direita e é responsável por grande parte dos casos de LTA atendidos em Rio Preto da Eva. Neste local, a doença é considerada tipicamente ocupacional (FRANCO et al., 2010; GUERRA et al., 2007; 2011)

A identificação das espécies de *Leishmania* que circulam em determinada região, principalmente onde as diferentes formas clínicas ocorrem simultaneamente, é de fundamental importância para o conhecimento ecológico e epidemiológico da infecção e planejamento de estratégias de controle da leishmaniose; como o tratamento precoce da forma cutânea da doença, que reduz a prevalência das formas graves, assim como sua morbidade e custos com o tratamento (GRIMALDI; TESH, 1993; CASTRO et al., 2005; BAÑULS et al., 2007; SILVEIRA et al., 2008; FRANÇA et al., 2009; COELHO et al., 2010; GUERRA et al.,

2011). A eletroforese de isoenzimas é o método mais utilizado na identificação de espécies de *Leishmania* e os dados obtidos por essa técnica, são em geral corroborados por outros métodos moleculares (CUPOLLILO et al., 2000, ANDRADE et al, 2005; COELHO, 2010).

No Amazonas, são cinco as espécies relacionadas à infecção na LTA: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) guyanensis*, sendo a última a espécie prevalente, contribuindo com mais de 80% dos casos notificados na região (NAIFF, 1998; ROMERO et al., 2001a; 2002; FIGUEIRA et al., 2008; COELHO et al., 2010; GUERRA et al., 2011; CHRUSCIK-TALHARI et al., 2011). Cada espécie apresenta particularidades concernentes às manifestações clínicas, a vetores, reservatórios, padrões epidemiológicos, à distribuição geográfica e até mesmo à resposta terapêutica (VALE; FURTADO, 2005).

Segue abaixo uma breve descrição das espécies causadoras das leishmanioses no estado do Amazonas:

i) *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Vianna, 1911) Matta, 1916: *Leishmania (V.) braziliensis* causa lesões cutâneas, mucosas e lesões disseminadas; mais recentemente definida como leishmaniose cutânea disseminada “borderline” (LCDB), uma forma intermediária entre as formas polares LMC e LCAD (SILVEIRA et al., 2004).

Estende-se de Norte a Sul do país em áreas de colonização recente e antiga. Está relacionada com animais domésticos como cavalos e cães. Sua transmissão esta associada ao vetor *Psychodopygus wellcomei* em florestas primárias no Pará e Sul da Bacia Amazônica (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

ii) *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson & Shaw, 1989: A espécie foi descrita por Lainson & Shaw (1989) e tem como reservatório natural o tatu-galinha, *Dasypus novemcinctus*. Cinco espécies de flebotomíneos são incriminadas na transmissão da doença:

Lutzomyia squamiventris (NAIFF et al., 1991), *L. paraensis* (GRIMALDI et al., 1991), *L. ayrozai* (LAINSON et al., 1994), *L. davisi* e *Psychodopygus hirsutus* (GIL et al., 2003).

Poucos casos de Leishmaniose causados por esta espécie foram relatados em humanos, havendo registros de casos no Brasil, na Guiana Francesa, Equador, Suriname, Martinica e Peru (PRATLONG et al., 2002; FOUQUE et al., 2007; VAN THIEL et al., 2010). Na Amazônia brasileira, foram relatados casos nos Estados do Amazonas, Pará (LAINSON, 2010) e Rondônia (dados não publicados). A *L. (V.) naiiffi* causa baixo grau de patogenicidade ao homem, estando associada apenas à forma cutânea, podendo até mesmo ocorrer cura espontânea (NAIFF et al., 1991; SILVEIRA et al., 2008; CAMPOS et al., 2008; VAN DER SNOEK et al.; 2009).

iii) *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972: A espécie *L. (L.) amazonensis* está associada a roedores (*Proechimys*, *Oryzomys*, *Neacomys*, *Nectomys* e *Dasyprocta*), marsupiais (*Marmosa*, *Metachirus*, *Didelphis* e *Philander*) e raposas (*Cerdocyon*). Os vetores incriminados são *L. flaviscutellata* e *L. olmeca nociva*, comumente encontrados em igapós, em floresta primária e secundária na Bacia Amazônica. Estes são essencialmente noturnos, com reduzida capacidade de vôo, habitando até cerca de um metro de altura nas árvores. *L. (L.) amazonensis* é relativamente rara em humanos devido à atividade noturna dos vetores e a pouca antropofilia destes (GENARO, 2000).

Esta espécie está associada às formas mucocutânea e cutânea difusa anérgica, sendo esta de difícil cura, mesmo associada a qualquer tipo de quimioterapia (MORAES; SILVEIRA, 1994; SILVEIRA et al., 2004; 2008; 2009; LAINSON, 2010). A forma leishmaniose cutânea disseminada “borderline” foi proposta como forma intermediária entre as formas cutânea e os polos extremos patogênicos mucocutânea e cutânea difusa, também causada por esta espécie (SILVEIRA et al., 2004; 2008; GARCIA et al., 2005).

Além da Bacia Amazônica, *L. (L.) amazonensis* também ocorre no Nordeste (Maranhão, Bahia e Ceará); Sudeste (Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo); Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e Sul (Paraná) (BRASIL, 2007).

iv) *Leishmania (Viannia) lainsoni* Silveira et al., 1987: Causa lesões ulceradas, infrequente em humanos e associada a roedores (*Agouti paca*) em florestas primária e secundária na Região Amazônica. Foi isolado nos estados do Pará, Amapá e Rondônia (SILVEIRA et al. 1987, 1991a, b) e recentemente isolada no Amazonas (CHRUSCIK-TALHARI et al., 2011). O vetor incriminado é a *Lutzomyia. ubiquitousis*, que é pouco antropofílica (LAINSON et al., 1990).

Além do Brasil, este flagelado foi encontrado no Peru e na Bolívia (LUCAS et al., 1994; MARTINEZ et al., 2001).

v) *Leishmania (Viannia) guyanensis* Flock, 1954: Ocorre ao Norte do Rio Amazonas, em floresta primária. Tem como hospedeiros reservatórios *Choloepus didactylus* (preguiça-real), *Tamandua tetradactyla* (tamanduá) e *Didelphis marsupialis* (mucura) [ARIAS; NAIFF, 1981]. O principal flebotomíneo envolvido na transmissão é a *Lutzomyia umbratilis* e com menor frequência *L. anduzei* e *L. whitmani*. *Lutzomyia umbratilis* vive em florestas primárias em troncos largos de árvores. Podem ser encontrados em grande número ao iniciar o dia nos troncos das árvores maiores e quando perturbados voam em pequenas nuvens, atacando a pessoa mais próxima (RANGEL; LAINSON, 2009; LAINSON, 2010).

A transmissão da infecção para humanos ocorre principalmente durante o dia quando trabalhadores adentram a mata (Figura 02). Na floresta com vegetação primária, o ciclo enzoótico da *L. (V.) guyanensis* não acontece da mesma forma que numa floresta secundária ou em áreas de plantio, onde há poucas ou nenhuma árvore de grande porte. Árvores com pequena circunferência apresentam microhabitats desfavoráveis para os flebotomíneos, devido à baixa umidade e a superfície lisa das árvores de tronco pequeno. Essas árvores

também não são ambientes favoráveis para animais considerados como fonte de repasto sanguíneo para esses insetos (LAINSON; SHAW, 2005).

Além da forma cutânea, esta espécie causa também a forma mucocutânea ao homem (NAIFF et al., 1988; GRIMALDI et al., 1991, NAIFF,1998; GUERRA et al., 2011; GUIZANI et al., 2011).

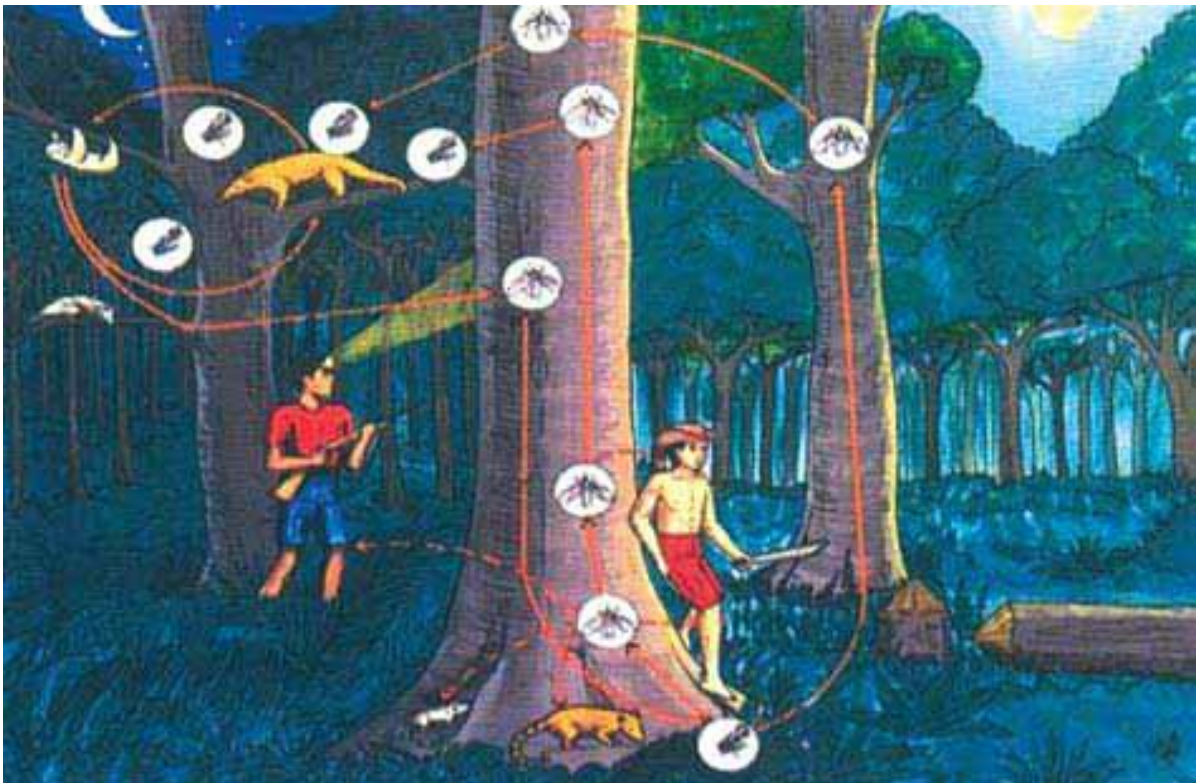


Figura 02. Ciclo de transmissão da *Leishmania (Viannia) guyanensis* na Amazônia brasileira. Fonte: BRASIL, 2010.

2.8- Proteômica

O proteoma é definido como todas as proteínas que estão presentes em uma determinada célula ou tecido num determinado momento, “the *PROTE*in complement expressed by a *genOME*”, refletindo a expressão de genes específicos em situações pontuais. São também incluídas as proteínas resultantes de processos pós-transcricionais e pós-

tradicionais, bem como complexos formados por essas biomoléculas (WASINGER et al., 1995; WILKINS et al., 1996; AHRENS et al., 2010; VALLEDOR; JORRÍN, 2011).

A proteômica estuda de forma descritiva e quantitativa desde o conjunto de proteínas de uma organela subcelular até aquelas de um ecossistema, suas variações na população, mudanças em resposta a um ambiente, ou decorrentes do desenvolvimento normal ou alterado, e modificações e interações com outras proteínas (VALLEDOR; JORRÍN, 2011; BARBOSA et al., 2012).

As metodologias empregadas em proteômica podem ser classificadas, de maneira geral, em *bottom-up* (ou *shotgun*) e *top-down*. A primeira inclui separação por cromatografia líquida dos peptídeos obtidos após digestão trípica de soluções protéicas complexas, seguida por análise por espectrometria de massas (MS). Já *top-down*, é um processo em que as proteínas intactas são submetidas à análise por MS. As abordagens *bottom-up* possuem muitas vantagens, como sensibilidade e reprodutibilidade, mesmo para proteomas complexos. Entretanto, as respostas obtidas são fragmentos de um todo e, embora seja possível a identificação de uma proteína com base em alguns peptídeos, as modificações pós-traducionais não são reconhecidas. Além disso, um peptídeo pode ser perdido durante a cromatografia ou não gerar espectros de massas adequados. Por esse motivo, a proteômica *top-down* tem recebido recentemente grande atenção da comunidade científica (AHRENS et al., 2010; ARMIROTTI et al., 2010; BARBOSA et al., 2012; ZURBIG; JAHN, 2012).

A eletroforese bidimensional e espectrometria de massa são as duas principais tecnologias proteômicas utilizadas (ASHTON et al., 2001; CARVALHO et al., 2006; GALDOS-RIVEROS et al., 2010). A primeira foi descrita por O'FARRELL em 1975 em trabalho onde foram obtidos mapas protéicos de *Escherichia coli*, pela combinação do ponto isoelétrico da proteína na primeira dimensão e o peso molecular na segunda, em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Desde então, tem-se verificado melhoramentos substanciais na

qualidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos, em consequência do desenvolvimento de equipamentos e reagentes específicos, como os gradientes de pH imobilizados em suportes, comercialmente disponíveis (SANTOS et al., 2004; CARVALHO et al., 2006).

Na eletroforese bidimensional, as proteínas são separadas em duas etapas. A primeira, focalização isoeétrica (IEF), sob influência de um campo elétrico, as moléculas migram em gel de poliacrilamida, com gradiente de pH imobilizado até atingirem um ponto (pH) no qual sua carga é igual a zero (ponto isoeétrico ou pI). Na segunda etapa (eletroforese bidimensional), as proteínas são submetidas à eletroforese com direção perpendicular a IEF em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) (PALMA et al., 2007; MAGDELDIN et al., 2012). O SDS, detergente aniônico que carrega negativamente as cadeias polipeptídicas, liga-se às proteínas em proporção de suas massas, permitindo que as mesmas sejam separadas de acordo com suas massas moleculares (CHOE et al., 2006).

Além da alta resolução e reprodutibilidade, a eletroforese 2-D permite também separar as várias formas protéicas que tenham sofrido modificações pós-tradução. Essas modificações conferem propriedades diferentes à proteína, em particular, diferente pI ou massa molecular (SANTOS et al., 2004; MAGDELDIN et al., 2012).

Para a visualização dos resultados, os géis são corados por impregnação pela prata ou por Comassie, sendo o primeiro método mais sensível. A técnica com Comassie é pelo menos 50 vezes menos sensível que a prata, mas é o método mais utilizado para se fazer a quantificação de proteínas por densidade. Para detecção de proteínas pouco abundantes, métodos mais sensíveis de detecção devem ser utilizados, como a autoradiografia e a fluorescência. Cada “spot”, obtido após uma corrida utilizando eletroforese-2D, é correspondente a apenas uma proteína. Desta forma, em apenas uma corrida, milhares de proteínas podem ser separadas, além de serem obtidas diversas informações, como ponto

isoeletrico, massa molecular e quantidade de cada proteina detectada (LEFKOVITS, 2003; PALMA et al., 2007).

Após coloração ou marcação das proteínas, cada “spot” detectado nos géis é registrado digitalmente, sob forma de imagem, que posteriormente é tratado usando *software* adequado à quantificação e análise comparativa de sua intensidade e dos demais “spots”, permitindo padronizar as diferenças existentes de gel para gel através de métodos de normatização (LEFKOVITS, 2003; SANTOS et al., 2004; MAGDELDIN et al., 2012).

Para a identificação das proteínas separadas pela eletroforese-2D, normalmente a espectrometria de massas (MS) é utilizada. Um espectrômetro de massas é um instrumento analítico que converte componentes de uma amostra em íons gasosos e mede suas massas. Nele, os íons são separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z). De uma maneira geral, um espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Na fonte de ionização, as moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa. No analisador de massas, os íons formados são separados de acordo com suas relações m/z e posteriormente detectados. O detector é conectado a um computador com programas de análises de dados (PALMA et al., 2007; BARBOSA et al., 2012)

Atualmente, existem dois principais métodos de ionização utilizados em proteômica: MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) e ESI (*Electrospray Ionization*). No método MALDI, os peptídeos são cocristalizados com uma matriz orgânica, geralmente ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. Após bombardeamento por laser, a matriz sublima e seus íons transferem a carga para os analitos, resultando na formação de íons peptídicos. No ESI, diferentemente do MALDI, uma solução aquosa com o analito é forçada a atravessar uma agulha capilar submetida à alta voltagem. A solução é ejetada como um aerossol de gotas altamente carregadas que, após evaporação do solvente por um fluxo de gás inerte aquecido,

geram formas ionizadas do analito (ZALUZEC et al., 1995; NGUYEN; FENN, 2007; BARBOSA et al., 2012).

2.8.1- Aplicações da Proteômica

Importante aplicação da proteômica é no campo da saúde, possibilitando a caracterização de proteínas diferencialmente expressas em organismos com alguma patologia, envolvendo a identificação de candidatos a biomarcadores para diagnóstico e detecção precoce de doenças, de novos alvos para terapêutica; e potencial para acelerar o desenvolvimento de drogas através de estratégias mais eficazes na avaliação do efeito terapêutico e toxicidade (APPELLA et al., 2000; HANASH, 2003; CHOE et al., 2006; KIM; KIM, 2007).

O plasma humano vem sendo amplamente utilizado em estudos proteômicos, pois é suscetível de conter, se não todas, quase todas as proteínas humanas, bem como proteínas derivadas de diversos microrganismos; algumas introduzidas em baixas concentrações provenientes de tecidos, enquanto outras, como albumina, em grandes concentrações. Diferentes formas modificadas de cada proteína são suscetíveis de estarem presentes, juntamente com milhões de distintos clones de imunoglobulinas. É difícil argumentar convincentemente que há qualquer estado de doença que não produza algum padrão específico de variação de proteínas no plasma (ANDERSON et al. 2002; 2004; FARRAH et al., 2011).

Em 2002, Anderson e Anderson publicaram trabalho de revisão onde foram citadas 289 proteínas do plasma estudadas por diferentes metodologias, sendo referência para o proteoma na época. Ainda em 2002, a Organização Internacional de Plasma Humano (HUPO) iniciou a primeira fase do Projeto Proteoma do Plasma Humano (PPP) onde avaliaram a

viabilidade de uma abordagem colaborativa para análise proteômica de plasma e soro humano, utilizando diversas tecnologias aplicadas por diferentes laboratórios, para um conjunto de espécimes de referência obtidos em 55 laboratórios de diversas partes do mundo. Essas amostras de plasma e soro divergiam quanto ao estado fisiológico, idade, sexo e etnia dos doadores e quanto ao anticoagulante utilizado, visando comparar vantagens e limitações das técnicas utilizadas. Dezoito laboratórios contribuíram com descobertas e identificações de proteínas por MS e os resultados foram integrados em banco de dados (OMENN et al., 2005). Em publicação do ano de 2006, onde uma reanálise rigorosa dos dados do PPP, utilizando testes estatísticos, resultou em 889 proteínas identificadas com nível de confiança de 95% (OMENN, 2006).

Desde então, vários trabalhos com diferentes experiências proteômicas foram realizados (STATES et al., 2006; ROOS et al., 2008; HAUDEK et al., 2009) e em 2011, através da aplicação de métodos computacionais avançados desenvolvidos para a análise e integração de dados muito grandes de diversos conjuntos gerados pela MS, o número de proteínas não redundantes identificadas aumentou para 1929, disponíveis em banco de dados *Peptide Atlas* (FARRAH et al, 2011; CAO et al., 2013).

Nos últimos anos, muitas questões biológicas importantes têm sido respondidas pela proteômica tendo sido descobertas centenas de proteínas candidatas a biomarcadores (BARBOSA et al., 2012). Muitos dados já foram obtidos em trabalhos com soro ou plasma de pacientes com câncer de ovário (PETRICOIN et al., 2002), de mama (TZU-CHIA et al., 2010), próstata (YASUI et al., 2003), pulmão (MACIEL et al., 2005), pacientes com síndrome de ovário policístico (WHITE et al., 2007; INSENSER et al., 2010), doenças coronarianas (VAISAR et al., 2007), infecciosas (ALBUQUERQUE, 2007; KIM et al., 2007; ZHANG et al., 2010), autoimunes (DE SENY et al., 2008), entre muitos outros.

Abordagens proteômicas também vêm sendo amplamente utilizadas no estudo de tripanossomatídeos. O perfil da expressão global de proteínas desses parasitos tem por objetivo a identificação e quantificação de proteínas específicas de estágios do ciclo de vida ou de organelas (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), proteínas diferenciadas em frações celulares de parasitos associados às distintas manifestações clínicas e proteínas envolvidas em imunoestimulação (VICKERS et al., 2004a; 2004b; WALKER et al., 2006; SILVERMAN et al., 2008; CUERVO et al., 2009; CUERVO et al., 2010). Além da compreensão dos processos de resistência às drogas (DRUMMELSMITH et al., 2003; DRUMMELSMITH et al., 2004; VERGNES et al., 2007) e identificação de candidatos a vacinas (FORGBER et al., 2006; DEA-AYUELA et al., 2006; GUPTA et al., 2007; HERRERA-NAJERA et al., 2009) e novos alvos de drogas (PAAPE; AEBISCHER, 2011).

Paape e Aebischer (2011), publicaram uma revisão histórica de como o proteoma de *Leishmania* spp., avançou ao longo do tempo, principalmente após a disponibilidade de informações genômicas em 2005, ilustrado por uma linha do tempo que consta desde trabalhos publicados entre a década de 80 e 2010 (Figura 03).

Candidatos a biomarcadores também vêm sendo pesquisados em soro de pacientes com Leishmaniose visceral. Rukmangadachar et al. (2011), na busca de proteínas diferencialmente expressas em soro de seis pacientes com LV infectados por *Leishmania donovani* e seis controles saudáveis, utilizando as técnicas 2D-DIGE (*Difference in gel electrophoresis*) e MS, identificaram maior expressão de Alfa-1 Glicoproteína Ácida e inibidor de C1 e menor expressão de Trastirretina, proteína de ligação ao Retinol e

Apolipoproteína A1 em soro de pacientes com LV. Os autores sugerem que estas proteínas possam ser usadas como biomarcadores de prognóstico.

Assim, tendo em vista as dificuldades ainda hoje encontradas quanto a compreensão da fisiopatologia da leishmaniose tegumentar americana e do acompanhamento do tratamento e da cura parasitológica da doença, a tecnologia 2D aliada a MS surgem como ferramentas úteis na busca de proteínas diferencialmente expressas em plasma de pacientes com LTA infectados por *L. (V.) guyanensis*, antes e após tratamento com antimonial pentavalente, e de doadores saudáveis, e a identificação de marcadores potenciais da doença e da cura.



Figura 03. Linha do tempo com publicações sobre proteômica de *Leishmania* spp.

Fonte: adaptado de Paape; Aebischer (2011).

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Avaliar os aspectos epidemiológicos de pacientes com LTA e identificar proteínas diferencialmente expressas entre plasma de indivíduos não infectados e pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis* antes e após tratamento com antimonial pentavalente

3.2- Objetivos Específicos

- Avaliar os aspectos epidemiológicos de pacientes com Leishmaniose tegumentar americana no Estado do Amazonas, BR,

Capítulo I: **Distribuição de casos de Leishmaniose cutânea no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil.**

(Revista Patologia Tropical- submetido em 31/01/2013)

Capítulo II: **Foco de Leishmaniose cutânea em estações experimentais e novos relatos de casos por *Leishmania (Viannia) naiffi* na região amazônica.**

- Identificar proteínas diferencialmente expressas entre plasma de indivíduos não infectados e de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis*, antes e após tratamento com antimonial pentavalente.

Capítulo III: **Análise de proteínas do plasma de pacientes com leishmaniose cutânea por eletroforese bidimensional**

4. CAPÍTULO I

**Distribuição de casos de Leishmaniose cutânea no município de Rio Preto da Eva,
Amazonas, Brasil.**

**Distribuição de casos de Leishmaniose tegumentar no município de Rio Preto da Eva,
Amazonas, Brasil**

Distribution of cases of cutaneous Leishmaniasis in the city of Rio Preto da Eva, Amazon,
Brazil

Luanda P. Figueira¹, Fabiane V. Soares¹, Maricleide de F. Naiff¹, Súsi S. da Silva¹, Thaís T. Espir¹, Francimeire G. Pinheiro¹ e Antonia Maria R. Franco¹

1. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.

Fonte de financiamento: FAPEAM

Endereço para correspondência: Dra. Antonia Maria Ramos Franco. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Av. André Araújo, 2.936 - Petrópolis - CEP 69060-001 - Manaus - AM, Brasil.

E-mail: afranco@inpa.gov.br

RESUMO

Foram analisados os aspectos clínicos e epidemiológicos de 90 pacientes com Leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas, Brasil, entre os anos de 2005 e 2012. Todos os pacientes apresentavam lesões cutâneas, cujas cepas isoladas foram caracterizadas por eletroforese de isoenzimas e identificadas como *Leishmania (Viannia) guyanensis* (80), *Leishmania (V.) naiffi* (3) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (7). A maior parte dos pacientes era do sexo masculino (70%) e a faixa etária com maior número de casos foi de 11 a 20 anos (31,7%). Em relação à ocupação, a maioria era agricultor ou caseiro (37,7%). Cerca de 95% dos casos de LTA são provenientes de focos endêmicos de zonas rurais, sendo que o assentamento Iporá, localizado no KM 127 da AM 010, apresentou o maior número de casos (33,3%). Concluimos que a LTA é uma parasitose endêmica de importância no município de Rio Preto da Eva, ocorrendo principalmente ao longo da rodovia AM 010, e seu perfil de transmissão foi preferencialmente silvestre, mas com destaque também para a possibilidade de transmissão da doença no intra-peridomicílio.

DESCRITORES: Leishmaniose tegumentar americana. *Leishmania*. Amazonas

ABSTRACT

We analyzed clinical and epidemiological characteristics of 90 patients with American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio Preto da Eva, Amazonas state, Brazil, between the years 2005 and 2012. All patients had skin lesions, whose isolates were characterized by isoenzyme electrophoresis and identified as *Leishmania (Viannia) guyanensis* (80), *Leishmania (V.) naiffi* (3) and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (7). Most patients were male (70%) and the age group with the highest number of cases was 11 to 20 years old (31.7%). In terms of occupation, most were farmers or home (37.7%). About 95% of cases of MCL are from rural areas of endemic foci and the settlement knowed as Iporá, located at KM 127 of the AM 010 roads, had the highest number of cases (33.3%). We conclude that the ATL is a parasitic disease endemic in Rio Preto da Eva (Amazonas State), occurring mainly along highway AM 010, and their transmission profile was rather wild, but especially also occur the possibility of disease transmission in intra-peridomicile.

KEY WORDS: Cutaneous Leishmaniasis. *Leishmania*. Amazonas

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma infecção causada por protozoário intracelular que pode ocasionar a forma cutânea, mucocutânea, visceral ou até mesmo manifestações sistêmicas dependendo da virulência e espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro (3, 18).

Endêmica em cinco dos sete continentes, a Leishmaniose tegumentar ocorre em regiões tropicais e subtropicais. Tem sido descrita em quase todos os países americanos, do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile (1, 27).

O Brasil encontra-se entre os cinco países com maior número de casos desta endemia que representa um grave problema de saúde pública, com ampla distribuição por todas as regiões geográficas, com destaque para a região Norte (40%), Nordeste (32%) e Centro-Oeste (16%) dos casos notificados (5) e apresenta um importante incremento de casos com duplo perfil epidemiológico observado, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos ou de áreas próximas a eles, e ainda, pelo aparecimento de surtos epidemiológicos associados especialmente ao acelerado processo de expansão das fronteiras agrícolas, implantação de áreas de garimpos, construção de rodovias e invasões na periferia das cidades (15, 20).

No início da década de 80 foram registrados casos em 19 unidades federadas e, em 2003, todos os estados brasileiros registraram autoctonia. Estima-se que entre 1990 e 2010 ocorreram mais de 618.207 casos, com as maiores taxas registradas na Região Norte do país (4, 23).

A população do Estado do Amazonas destaca-se como uma das mais acometidas pela LTA no país onde, em 2011, foram notificados 2.379 casos. Os municípios com maior

número de casos da doença em 2011 foram: Manaus com 1.080 casos, seguido de Rio Preto da Eva com 190 casos e Presidente Figueiredo com 157 casos (41).

No Brasil, incluindo o Norte do país, foram descritas até o momento sete espécies de leishmanias, agentes etiológicos da doença humana: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (25, 37).

A identificação das espécies de *Leishmania* que circulam em determinada região, principalmente onde as diferentes formas clínicas ocorrem simultaneamente, é muito importante para o conhecimento ecológico e epidemiológico da infecção e planejamento de estratégias de controle da leishmaniose (2, 7, 9, 18). Desta forma, este estudo teve como objetivo analisar aspectos clínicos e epidemiológicos de 90 pacientes com LTA, atendidos em uma Unidade Básica de Saúde e no Hospital do município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas, entre os anos de 2005 e 2012.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A cidade de Rio Preto da Eva, Amazonas, foi criada na década de 60, servindo de conexão rodoviária entre Manaus e Itacoatiara. Situa-se próximo ao Km 80 da Rodovia AM-010 (3°07'06"S, 59°W), distando 57,5 Km da capital do Estado, fazendo parte da Região Metropolitana de Manaus. A população é formada por 26.948 pessoas e apresenta 5.813 Km² de área territorial, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (24). A cobertura vegetal é de floresta tropical úmida de terra-firme, apresentando grande diversidade de

espécies. O clima é tropical com temperatura média anual oscilando em torno dos 26C°, com precipitação pluviométrica superior a 2000mm/ano e umidade relativa superior a 80% .

Casos clínicos

Pacientes com suspeita de LTA foram examinados para o diagnóstico da infecção, tendo sido atendidos no Hospital Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão, em Rio Preto da Eva, Amazonas. O estudo foi desenvolvido de acordo com os requisitos do Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96, sendo aprovado pelo comitê de ética em pesquisas envolvendo seres humanos do INPA sob o número 193/2008.

Exames Parasitológicos e Isolamento Parasitário

Todos os pacientes foram submetidos a exame direto por escarificação da borda das lesões cutâneas para pesquisa de amastigotas em lâminas, utilizando-se corante Panótico e microscopia óptica. O material escarificado da borda das lesões também foi semeado em meio de cultivo ágar sangue NNN (Novy e MacNeal, 1904; Nicolle, 1908) e posteriormente expandido em meio líquido Schneider completo (pH 7,2 contendo 10% de Soro Fetal Bovino inativado), para preparação de massa parasitária utilizada na caracterização bioquímica e criopreservação.

Caracterização Bioquímica

As cepas isoladas foram caracterizadas pela técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de agarose, conforme protocolo descrito por Cupolillo (10), utilizando oito sistemas

enzimáticos: Malato Desidrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37), Isocitrato Desidrogenase (IDH, E.C.1.1.1.42) com substrato NAD e NADP, Enzima Málica (ME, E.C.1.1.1.40), Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH, E.C.1.1.1.44), Aconitato Hidratase (ACON, E.C.4.2.1.3) e Hexoquinase (HK, E.C.2.7.1.1). A identificação das espécies foi obtida através da comparação dos perfis isoenzimáticos das amostras com cepas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8).

RESULTADOS

Durante o período de estudo, foram atendidos 90 pacientes no Hospital Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão, em Rio Preto da Eva, onde 63 (70%) eram do sexo masculino e 27 (30%) do sexo feminino (Tabela). A idade dos pacientes variou de 2 a 69 anos. Para o sexo masculino, a faixa etária com maior número de casos foi de 11 a 20 anos (31,7%), seguida da faixa entre 21 e 30 anos (23,8%). Para o sexo feminino, o maior número de casos foi entre 21 a 30 anos (44,4%). A média de idade entre os homens ou mulheres foi de 26 anos. No geral, a faixa com maior número de casos foi de 21 a 30 anos (30%), seguido de 11 a 20 anos (26,6%). A incidência cumulativa para essa comunidade foi de 73 casos de LTA para cada 10000 habitantes em 2011 (41) [Figura 1].

Em relação à ocupação, a maioria dos pacientes era agricultor ou caseiro (37,7%). Em seguida, estudantes que correspondem a 27,7% dos pacientes.

Na população estudada, 69 pacientes (76,6%) apresentaram infecção primária, nove (10%) apresentaram infecção secundária e de 12 pacientes (13,3%) não havia dados disponíveis.

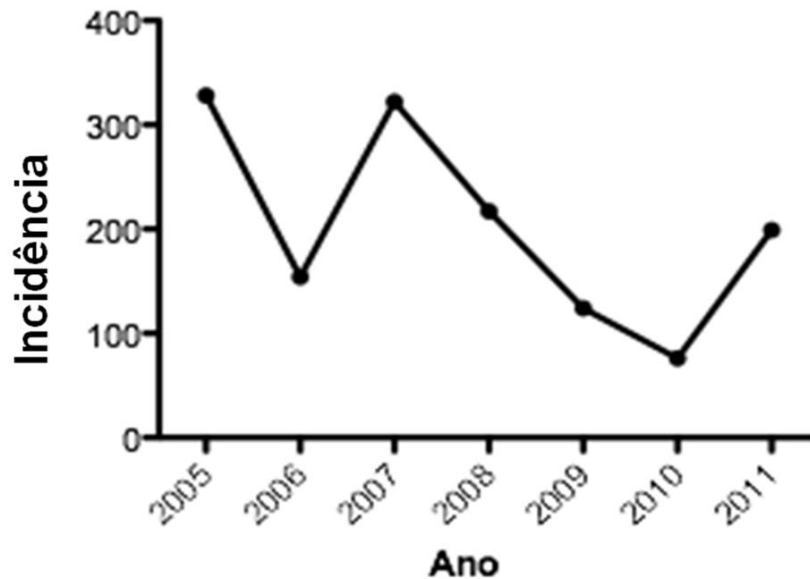


Figura 1. Leishmaniose tegumentar americana em Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. Incidência da Leishmaniose Tegumentar Americana, no período de 2005 a 2011 (41).

Dos exames realizados, 90% (81) apresentaram positividade para o exame direto e 100% para o isolamento em meio de cultura ágar sangue NNN (Neal, Novy & Nicolle).

Do total de 90 cepas caracterizadas, 80 (89%) foram de *L. (V.) guyanensis*, sete (7,77%) de *L. (L.) amazonensis* e três (3,33%) de *L. (V.) naiffi*, conforme mostra a tabela.

Os pacientes infectados com *L. (L.) amazonensis* apresentaram uma lesão em sua maioria (seis pacientes) e apenas um apresentou três lesões. Os com *L. (V.) naiffi* apresentaram duas (um paciente) e três lesões (dois). Os infectados com *L. (V.) guyanensis* apresentaram uma lesão em sua maioria (45), seguido de duas lesões (15 pacientes), de acordo com a tabela.

Os três pacientes infectados com *L. (V.) naiffi* apresentaram lesões em membros inferiores. Os com *L. (L.) amazonensis* apresentaram lesão em membro inferior (dois

pacientes), membro superior (quatro pacientes) e um paciente apresentou lesões em ambos os membros. A maior parte dos pacientes infectados com *L. (V.) guyanensis* apresentou lesões em membro superior (33,75%), seguido de membro inferior (31,25%).

Todas as lesões eram cutâneas e seus tamanhos variaram entre 06x08mm a 31x24mm nos pacientes infectados por *L. (V.) naiffi*, 06x09mm a 15x29mm por *L. (L.) amazonensis* e 03x03mm a 60x60mm por *L. (V.) guyanensis* (Figura 2).

A maioria dos casos de LTA que foram atendidos é de focos endêmicos de zonas rurais (95,5%). O assentamento Iporá localizado no KM 127 da AM 010 (Figura 3) apresentou o maior número de casos (33,3%).

Tabela

Dados clínicos - epidemiológicos de Leishmaniose Cutânea em Rio Preto da Eva, Amazonas. Característica dos casos de acordo com a espécie de *Leishmania* identificada

Dados	Espécimes			Total
	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. naiffi</i>	<i>L. amazonensis</i>	
Número de casos	80	03	07	90
Origem endêmica N (%)				
Rural	77 (96,25)	02 (66,66)	07 (100,00)	86 (95,55)
Indeterminado	03 (03,75)	01 (33,33)	-	04 (04,44)
Atividade profissional N (%)				
Agricultor/Caseiro	29 (36,25)	01 (33,33)	04 (57,14)	34 (37,77)
Estudante	24 (30,00)	01 (33,33)	-	25 (27,77)
Outros	27 (33,75)	01 (33,33)	03 (42,85)	31 (34,44)
Idade (anos) N (%)				
0 a 10	12 (15,00)	-	-	12 (13,33)
11 a 20	23 (28,75)	-	01 (14,28)	24 (26,66)
21 a 30	22 (27,50)	02 (66,66)	03 (42,85)	27 (30,00)
31 a 40	09 (11,25)	-	-	09 (10,00)
41 a 50	08 (10,00)	01 (33,33)	02 (28,57)	11 (12,22)
51 a 60	04 (05,00)	-	01 (14,28)	05 (05,55)
61 a 70	02 (02,50)	-	-	02 (02,22)
Sexo				
Masculino	57 (71,25)	02 (66,66)	04 (57,14)	67 (70,00)
Feminino	23 (28,75)	01 (33,33)	03 (42,85)	27 (30,00)
Local das lesões N (%)				
Cabeça	04 (05,00)	-	-	04 (04,44)
PESCOÇO	02 (02,50)	-	-	02 (02,22)
Tronco	05 (06,25)	-	-	05 (05,55)
Membro superior	27 (33,75)	-	04 (57,14)	31 (34,44)
Membro inferior	25 (31,25)	03 (100,00)	02 (28,57)	30 (33,33)
Múltiplas	15 (18,75)	-	01 (14,28)	16 (17,77)
Indeterminado	02 (02,50)	-	-	02 (02,22)
Tamanho das lesões (mm)	03x03 a 60x60	06x08 a 31x24	06x09 a 15x29	
Numero de lesões N (%)				
01	45 (56,25)	-	06 (85,71)	51 (56,66)
02	15 (18,75)	01 (33,33)	-	16 (17,77)
03	05 (06,25)	02 (66,66)	01 (14,28)	08 (08,88)
≥ que 04	15 (18,75)	-	-	15 (16,66)

N = Número de casos; (%) = percentagem correspondente ao número de casos.

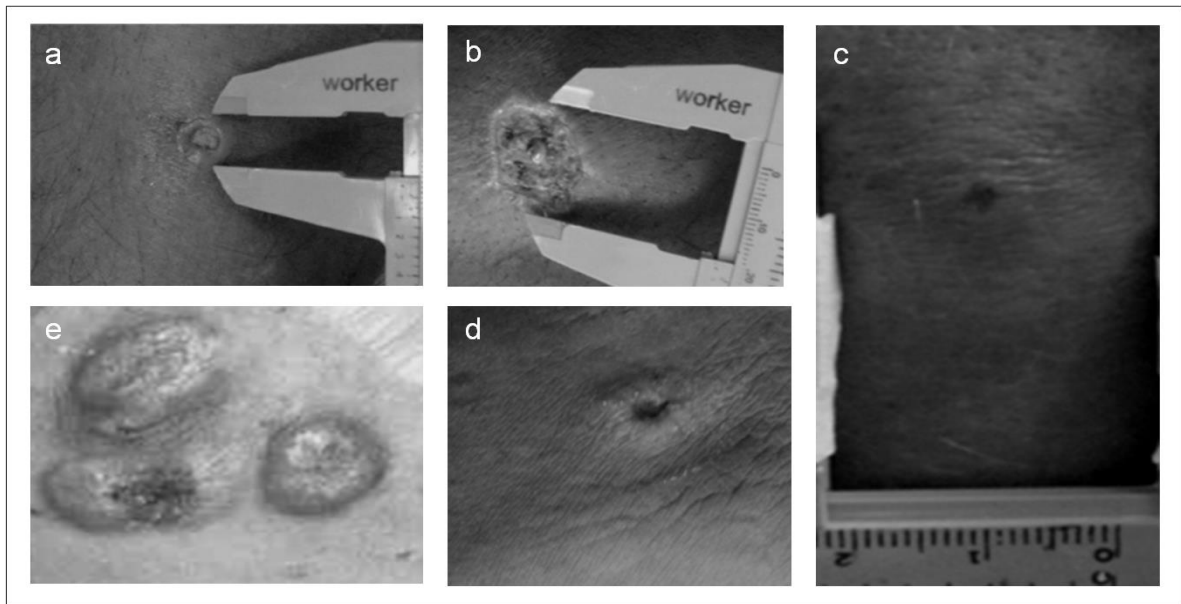


Figura 2. Lesões cutâneas de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Rio Preto da Eva. Em sentido horário, lesões de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis* (a, b), *Leishmania (V.) naiffi* (c, d) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (e).

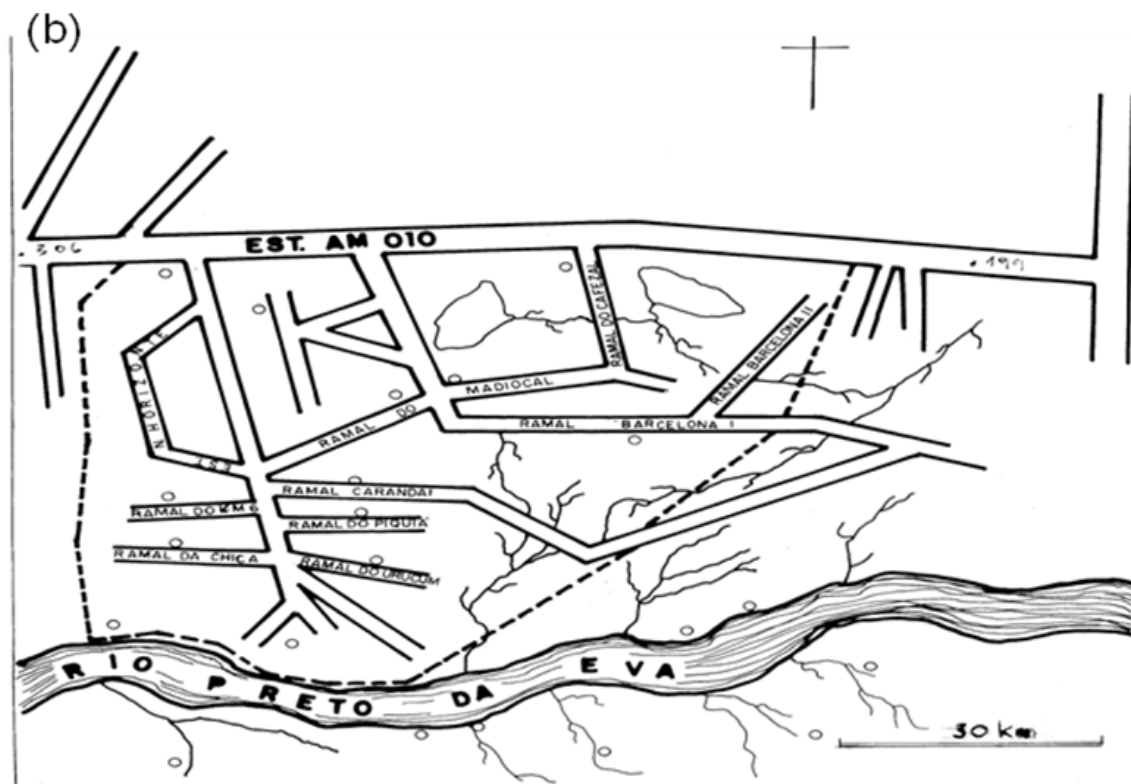
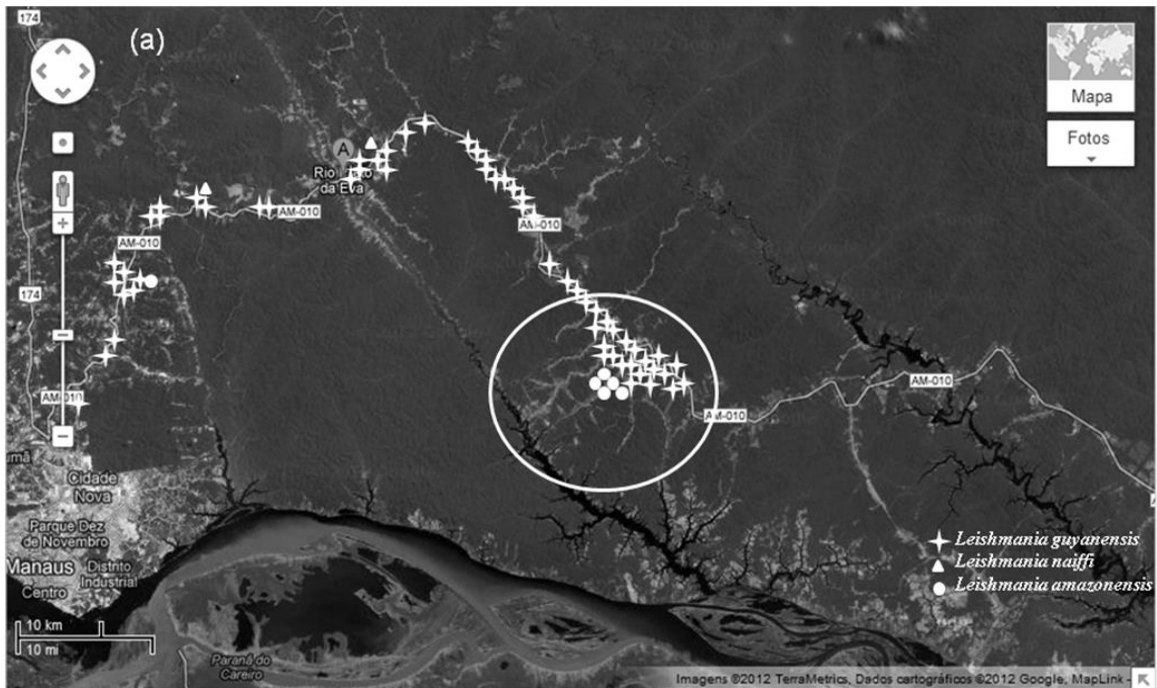


Figura 3. Imagem de satélite (a) mostrando a distribuição geográfica dos casos de LTA na rodovia AM010, atendidos no município de Rio Preto da Eva, no período de 2005 a 2012. Localização dos casos e distribuição por espécie de *Leishmania* isolada e identificada por eletroforese de isoenzimas. Em destaque, o assentamento Iporá, localizado no km 127 da rodovia AM 010. Mapa do assentamento Iporá (b) no município de Rio Preto da Eva, AM.

DISCUSSÃO

A rodovia AM-010, no Estado do Amazonas, liga a cidade de Manaus a Itacoatiara, passando pelo município de Rio Preto da Eva e possui 180 km de extensão. Possui diversos assentamentos agrários distribuídos ao longo de seu percurso. Grande parte dos casos de LTA atendidos pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), em Manaus, é oriunda desta rodovia (19, 21). Os pacientes atendidos na Unidade Básica de Saúde e no Hospital do Município de Rio Preto da Eva, neste trabalho, tiveram origem ou relataram ter se infectado ao longo da rodovia AM-010 ou em ramais distribuídos por sua extensão (95% dos casos).

A proporção entre o sexo masculino e feminino infectados está de acordo com outros estudos (8, 9, 13, 20, 21, 30, 32, 33). Em relação à idade, a faixa etária com maior número de casos corrobora com outros trabalhos onde a prevalência é de adultos jovens (9, 20, 33). Agricultores e caseiros foram às profissões mais acometidas. Estes ficam diretamente em contato ou muito próximos à mata durante muitas horas, sendo estes ambientes propícios a picadas de insetos (11, 30).

No Amazonas, quatro espécies são incriminadas na transmissão de LTA: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) guyanensis*, sendo a última a espécie mais prevalente (9, 12, 33, 35). Neste estudo, apenas *L. (V.) braziliensis* não foi detectada. Segundo Romero et al. (35), são raros os casos de LTA causados por esta espécie nas adjacências de Manaus, Amazonas. Diferente de outras pesquisas onde foram relatados casos de LTA causados por *L. (V.) braziliensis*, incluindo casos de forma mucosa da doença em Manaus (9, 22).

Os pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* apresentaram uma ou várias lesões, as quais podem ser causadas por múltiplas picadas de flebotomíneos infectados ou por

disseminação linfática metastática (29). Segundo Guerra et al. (22), esta espécie é um agente causador da forma mucosa em diversos pacientes que tiveram a forma cutânea tratada de forma inadequada na região Amazônica. A forma mucosa é mais comum em homens e estes tendem a desenvolver formas mais graves da doença com elevada incidência de perfuração e envolvimento de estruturas externas da cavidade nasal.

A maior parte dos pacientes infectados com *L. (L.) amazonensis* (6/7), apresentou apenas uma lesão, corroborando com resultados observados na literatura. Esta espécie está associada às formas mucocutânea e cutânea difusa anérgica, sendo esta de difícil cura, mesmo associada a qualquer tipo de quimioterapia (29, 31, 38-40). Mais recentemente, foi proposta a forma de leishmaniose cutânea disseminada “borderline” como forma intermediária entre as formas cutânea e os polos extremos patogênicos mucocutânea e cutânea difusa, também causada por esta espécie (16, 38, 39).

São poucos os casos de LTA causados por *L. (V.) naiffi* descritos na literatura (9, 12, 17, 26, 34, 42), tendo sido descritos apenas três pacientes infectados (3,33%) por esta espécie neste estudo. A *L. (V.) naiffi* causa baixo grau de patogenicidade ao homem, estando associada apenas à forma cutânea, podendo até mesmo ocorrer cura espontânea (6, 34, 39, 43).

O projeto de Assentamento Iporá fica localizado no Km 127 da AM 010, em sua margem direita e é responsável por grande parte dos casos de LTA de Rio Preto da Eva, segundo município em número de casos no Estado do Amazonas, corroborando com este estudo. Neste local, a doença é considerada tipicamente ocupacional (14, 21, 32). Franco et al. (14) realizou levantamento entomológico nesta área com intuito de conhecer a fauna flebotomínica e o principal local de transmissão humana da LTA (ambiente silvestre, intradomiciliar e peridomiciliar). Foi verificado que no ambiente de floresta, a espécie *Lutzomyia umbratilis* foi a mais abundante (29,3%), seguida de *Lu. flaviscutellata* (16,8%).

No peridomicílio, local de maior atividade humana, onde os assentados desenvolvem atividades como o cultivo de hortifrutigranjeiros, *Lu. umbratilis* e *Lu. flaviscutellata* foram registradas, sendo a primeira a mais abundante, nas proximidades de árvores e plantações. Os assoalhos, embaixo das residências, registraram alta presença de *Lu. flaviscutellata*, fato de extrema importância devido a possibilidade de transmissão para roedores e até mesmo ao homem, pela proximidade com o domicílio. Este espaço normalmente é utilizado como abrigo para animais como galinhas, cães e outros animais. O intradomicílio apresentou baixa riqueza de espécies e menor abundância, sendo *Lu. umbratilis* espécie frequente.

Quatro, dos sete casos de LTA causados por *L. (L.) amazonensis* deste trabalho, foram infectados no Assentamento Iporá, onde o flebotomíneo *Lu. flaviscutellata*, seu principal vetor, foi registrado em abundância em ambiente silvestre e em peridomicílio. O menor número de casos de LTA causado por *L. (L.) amazonensis* provavelmente está relacionado ao fato do vetor *Lu. flaviscutellata* ser pouco antropofílico e de hábito essencialmente noturno (28, 36).

De acordo com Guerra et al. (21), 20,65% dos casos de LTA atendidos na FMT-AM em 2005 eram de crianças de 0 até 14 anos de idade. Os autores citaram a possibilidade de transmissão da doença no intra-peridomicílio, justificado por casos de LTA em menores de cinco anos de idade e pela presença de animais domésticos servindo de atrativo aos vetores e pela proximidade das habitações com a mata; e a transmissão na mata, ocorrendo em crianças maiores que auxiliam seus pais em atividades agrícolas, busca de alimentos ou caça. Este dado está de acordo com este trabalho, onde 20% dos casos são de crianças na mesma faixa etária. Destas, três crianças tinham idade igual ou inferior a cinco anos. O fato de todas as crianças e idosos com LTA neste trabalho terem sido infectados por *L. (V.) guyanensis* e a presença de seu vetor *Lu. umbratilis* em abundância no peridomicílio e em domicílio no

Assentamento Iporá, reforçam a transmissão da doença no intra-peridomicílio na região estudada.

Concluimos que a LTA é uma parasitose endêmica de importância no município de Rio Preto da Eva, ocorrendo principalmente ao longo da rodovia AM010, e seu perfil de transmissão foi preferencialmente silvestre, mas com destaque também para a possibilidade de transmissão da doença no intra-peridomicílio. Trabalhos de educação em saúde visando medidas de controle para prevenção da doença devem ser realizados junto à população local.

É de grande importância a identificação da espécie de *Leishmania* na patogenia da LTA na Amazônia, onde a doença resulta da complexa interação da resposta imune do homem com as diferentes espécies do parasito, com potenciais patogênicos distintos; bem como o tratamento precoce da forma cutânea da doença, que reduz a prevalência das formas graves da leishmaniose, assim como sua morbidade e custos com tratamento (13, 39).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, em especial a Roberto Dantas de Farias pelo auxílio no transporte da equipe a Rio Preto da Eva e ao microscopista do Hospital deste município, Antônio José Barros da Silva, por todo apoio durante o período de realização do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7(5): e35671, 2012.
2. Bañuls A, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology* 64: 1-109, 2007.
3. Bogdan C. Leishmaniasis in rheumatology, hematology, and oncology: epidemiological, immunological, and clinical aspects and caveats. *Ann Rheum Dis* 71: 60–66, 2012.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial*. Brasília: MS, p 136, 2006.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos e Notificações (SINAN). Informe Técnico. Brasília: MS, 2011.
6. Campos MB, De Castro Gomes CM, de Souza AA, Lainson R, Corbett CE, Silveira FT. In vitro infectivity of species of *Leishmania* (*Viannia*) responsible for American cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Res* 103: 771–776, 2008.
7. Castro EA, Luz E, Telles FQ, Pandey A, Biseto A, Dinaiski M, Sbalqueiro I, Soccol VT. Eco-epidemiological survey of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira valley River, Paraná State, Brazil. *Acta Tropica* 93: 141-149, 2005.
8. Chagas AC, Pessoa FAC, Medeiros JF, Py-Daniel V, Mesquita EC, Balestrassi DA. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. *Rev Bras Epidemiol* 9: 186-192, 2006.
9. Coelho LIC, Paes M, Guerra JA, Barbosa MG, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão Filho S. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res* 108: 671-677, 2010.

10. Cupolillo E. Perfil enzimático e análise numérica de variantes do gênero *Leishmania* encontrados no novo mundo. Rio de Janeiro [Dissertação de Mestrado- Instituto Oswaldo Cruz], 1992.
11. Dourado MIC, Noronha CV, Alcantara N. Epidemiology of leishmaniasis related to agriculture and prospecting in a locality of the State of Bahia, Brazil. *Revista de Saúde Pública* 23: 2-8, 1989.
12. Figueira LP, Zanotti M, Pinheiro FG, Franco AMR. Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 512-514, 2008.
13. França EL, Mandadori MN, França JL, Botelho ACF, Ferrari CKB, França ACH. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Juína, Mato Grosso, Brasil. *Scientia Medica* 19: 103-107, 2009.
14. Franco AMR, Pereira MAS, Freitas, RA. Diversidade da fauna de flebotomíneos em área de assentamento no município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas .In: Bermudéz EGC, Teles BR, Rocha RA, organizadores. *Entomologia na Amazônia Brasileira* . Editora Inpa. Manaus, p. 183-206, 2010.
15. Fundação Nacional de Saúde. *Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, 2000.
16. Garcia FCB, Santos SSR, Chociay MF, Medeiros ACR, Roselino AMF. Métodos subsidiários para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA): comparação dos resultados do sequenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de leishmânia em amostras cutâneo-mucosas. *An Bras Dermatol* 80: 340-345, 2005.
17. Grimaldi GJr, Momen H, Naiff RD, Mahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 44: 645–661, 1991.
18. Grimaldi JrG, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Review* 6: 230-250, 1993.

19. Guerra JAO, Talhari S, Paes MG, Garrido M, Talhari JM. Clinical and diagnostic aspects of American Tegumentary Leishmaniosis in soldiers simulatenously exposed to the infection in the Amazon Region. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 587–590, 2003.
20. Guerra JAO, Ribeiro JAS, Coelho LIARC, Barbosa MG, Paes MG. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. *Cad Saude Publica* 22: 2319-2327, 2006.
21. Guerra JA, Barbosa MG, Loureiro AC, Coelho CP, Rosa GG, Coelho LI. American tegumentary leishmaniasis in children: epidemiological aspects of cases treated in Manaus, Amazonas, Brazil. *Cad Saude Publica* 23: 2215-2223, 2007.
22. Guerra JA, Prestes SR, Silveira H et al. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e980, 2011.
23. Guimarães VCFV. Avaliação da infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. no Município de São Vicente Férrer, Pernambuco. Pernambuco [Dissertação de Mestrado-Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães], 2011.
24. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_Projecoes_Populacao/Estimativas_2012/estimativa_2012_municipios.pdf. Acesso em: 20/08/2012.
25. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in the New World. In: Collier L, Balows A, Sussman. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*. Arnold, London, p. 313-349, 2005.
26. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR, Ishikawa EA. Cutaneous Leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. *Ann Parasitol Hum* 65: 282–284, 1990.
27. Lainson R. The American Leishmaniases: Some observations on their ecology and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 569-596, 1983.

28. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAY. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco- epidemiology of the disease in Amazonia *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 435-443, 1994.
29. Lainson, R. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev Pan-Amaz Saude* 1: 13-32, 2010.
30. Martins LM, Rebelo JM, dos Santos MC, Costa JM, da Silva AR, Ferreira LA. Eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Buriticupu, Amazon region of Maranhão State, Brazil, 1996–1998. *Cad Saude Publica* 20: 735-743, 2004.
31. Moraes MAP, Silveira FT. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med Trop* 36: 459-463, 1994.
32. Naiff Jr. RD, Pinheiro FG, Naiff MF, Souza IS, Castro LM, Menezes MP, Franco, AMR. Estudo de uma série de casos de Leishmaniose tegumentar americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 38: 103-114, 2009.
33. Naiff MF. Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região. Rio de Janeiro [Dissertação de Mestrado-Fundação Instituto Oswaldo Cruz], 1998.
34. Naiff RD, Freitas RA, Naiff MF, Arias J R, Barrett TV, Momen H, Grimaldi G Jr. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 317–321, 1991.
35. Romero GA, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO, Shaw JJ. The rarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 131–136, 2002.
36. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, de Souza AA, Ishikawa EIA, Braga RR. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85:735-738, 1991.
37. Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AAA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia)*

lindenbergi n. sp., a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite* 85: 43-50, 2002.

38. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 239-251, 2004.

39. Silveira FT, Mülher SR, Souza AA, Lainson R, Gomes CM, Laurent MD, et al. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) Amazonensis*. *Rev Para Med* 22: 9-20, 2008.

40. Silveira FT, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 423-431, 2009.

41. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>. Acesso em 30/09/2012.

42. Tojal da Silva, AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health* 11: 1388 – 1398, 2006.

43. Van der Snoek EM, Lammers AM, Kortbeek LM, Roelfsema JH, Bart A, Jaspers CA. Spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania naiffi* in two Dutch infantry soldiers. *Clin Exp Dermatol*. 34: 889-891, 2009.

5. CAPÍTULO II

**Foco de Leishmaniose cutânea em estações experimentais e novos relatos de casos
por *Leishmania (Viannia) naiffi* na região amazônica**

Foco de Leishmaniose cutânea em estações experimentais e novos relatos de casos por *Leishmania (Viannia) naiffi* na região amazônica

Focus of dermal leishmaniasis in experimental station and new records of cases caused by *Leishmania (Viannia) naiffi* in Amazonian region

Figueira, L.P.; Soares, F.V.; Silva, A.V.; Silva, S.S.; Espir, T, T.; Pinheiro, F.G; Naiff, M.F.; Gomes, L. H. M; Almeida-Campos, F. R.; Franco, A.M.R.

RESUMO

No período de 1992 a 2011, foram diagnosticados 11 pacientes infectados por cepas caracterizadas por eletroforese de isoenzimas como *Leishmania (Viannia) naiffi*, sendo um deles reinfectado um ano após a primeira infecção e tratamento com pentamidina. Estes eram oriundos dos Estados do Amazonas, Pará e Rondônia. Considerando os poucos casos até então descritos da doença causada por essa espécie do parasito, bem como o fato de que das 12 cepas isoladas, cinco foram de pacientes que se infectaram em Estações Experimentais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, sugere-se que estas sejam áreas de foco para esta espécie de *Leishmania*. Esse dado é reforçado pela presença de vetores associados à transmissão de *L. (V.) naiffi* nas Estações Experimentais e outros casos de infecção ocorridos nas mesmas áreas, descritos em literatura. Também é feita a primeira descrição de caso identificado de leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) naiffi* no estado de Rondônia.

Palavras-Chave: Leishmaniose Tegumentar Americana, *Leishmania (Viannia) naiffi*, caracterização – estações experimentais

ABSTRACT

During the period of years 1992-2011, 11 patients were diagnosed infected with strains characterized by isoenzyme electrophoresis analysis as L. (V.) naiffi, one case being reinfected one year after the primary infection and after used pentamidine as a treatment. These patients were from the states of Amazonas, Pará, and Rondônia. Considering the few human cases described with this disease caused by L. (V.) naiffi, as well as the fact that the 12 isolates, five were from patients who were infected in Experimental Stations of the National Institute of Amazonian Research, we suggest that these areas could be considered as a focus of dermal leishmaniasis caused by this species of Leishmania. This is reinforced by the presence of vectors associated with the transmission of L. (V.) naiffi at Experimental Stations and other cases of infection occurring in the same localities described in the literature. It is also the first report of cutaneous leishmaniasis caused by this leishmania species in the Rondônia state.

Key-words: American Tegumentary Leishmaniasis, Leishmania (Viannia) naiffi, characterization – Experimental Stations

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose causada por protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, transmitida ao homem pela picada de fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo. No Brasil e na região Norte, tem-se a descrição de sete espécies de leishmanias, agentes etiológicos da doença: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (Leishmania) amazonensis* (SILVEIRA et al., 2002; LAINSON; SHAW, 2005). A severidade da doença varia da forma cutânea benigna e de cura espontânea até formas severas, às vezes mutilantes, como a leishmaniose mucocutânea (DORVAL et al., 2006).

Entre estas espécies, a *L. (V.) naiffi* tem despertado particular atenção devido à escassez de relatos de casos de LTA em humanos causados por esse patógeno. A espécie foi descrita por Lainson & Shaw (1989) e tem como reservatório natural o tatu-galinha, *Dasypus novemcinctus*. Cinco espécies de flebotomíneos são incriminadas na transmissão da doença: *Lutzomyia squamiventris* (NAIFF et al., 1991), *L. paraensis* (GRIMALDI et al., 1991), *L. ayrozai* (LAINSON et al., 1994), *L. davisi* e *Psychodopygus hirsutus* (GIL et al., 2003).

A espécie de flebotomíneo *L. ayrozai* parece ser o principal vetor de infecções em tatus. Esta espécie não é considerada altamente antropofílica e por este motivo, provavelmente está relacionada às reduzidas taxas de infecção por *L. (V.) naiffi* em humanos no Brasil (LAINSON, 2010). Poucos casos de Leishmaniose ocasionados por *L. (V.) naiffi* foram relatados em humanos, havendo registros de casos no Brasil, na Guiana Francesa, Equador, Suriname, Martinica e Peru (PRATLONG et al., 2002; FOUQUE et al., 2007; VAN THIEL et al., 2010). Na Amazônia brasileira, foram relatados casos nos Estados do Amazonas e Pará (LAINSON, 2010).

No presente estudo, são descritos novos registros de *L. (V.) naiffi* durante os anos de 1992 a 2011, isolados de pacientes com suspeita de LTA, oriundos de distintas localidades da Região Norte do Brasil, sugerindo-se a ocorrência de áreas de foco em leishmaniose cutânea em estações experimentais na região amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas isoladas e identificação: Os pacientes foram atendidos pela equipe técnica do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do INPA e submetidos a exame clínico e laboratorial. Dos pacientes com diagnóstico positivo para LTA, o

material escarificado da borda da lesão cutânea foi semeado em meio de cultivo NNN (NOVY; MACNEAL, 1904; NICOLLE, 1908) e expandidos em meio líquido completo “Schneider Drosophila Medium” pH 7,2 acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi), para preparação de massa parasitária para criopreservação e análise bioquímica. As 12 cepas isoladas foram caracterizadas pela técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de agarose, conforme protocolo previamente descrito (CUPOLILLO et al., 1994), utilizando oito sistemas enzimáticos: Malato Desidrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37), Isocitrato Desidrogenase (IDH, E.C.1.1.1.42) com substrato NAD e NADP, Enzima Málica (ME, E.C.1.1.1.40), Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH, E.C.1.1.1.44), Aconitato Hidratase (ACON, E.C.4.2.1.3) e Hexoquinase (HK, E.C.2.7.1.1). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CEP) do INPA (protocolo nº.193/2008).

Período e local de coleta: Os flebotomíneos foram coletados num período de quatro meses (junho-setembro/2010), em dois dias consecutivos ao final de cada mês, nas Estações Experimentais Porto Alegre e Esteio, localizadas na área do Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais (PDBFF/ZF3) do INPA, localizada no Km 50 da BR 174, Manaus, Amazonas-Brasil (Fig1). Foram utilizadas 10 armadilhas de luz do tipo CDC (CDC "miniature"- Hausherr Machine Works, New Jersey, EUA), sendo duas armadilhas distribuídas por árvore em estrato vertical de 1m e 10m de altura do solo, distando 200m a partir da borda mata. As armadilhas foram instaladas sempre no mesmo local e horário, acionadas a partir das 17 horas e retiradas às 7 horas do dia seguinte. A triagem e dissecação dos insetos foram realizadas no local de coleta segundo as técnicas

descrita por Arias e Freitas (1978). Os espécimes foram identificados segundo a classificação de Young e Duncan (1994).

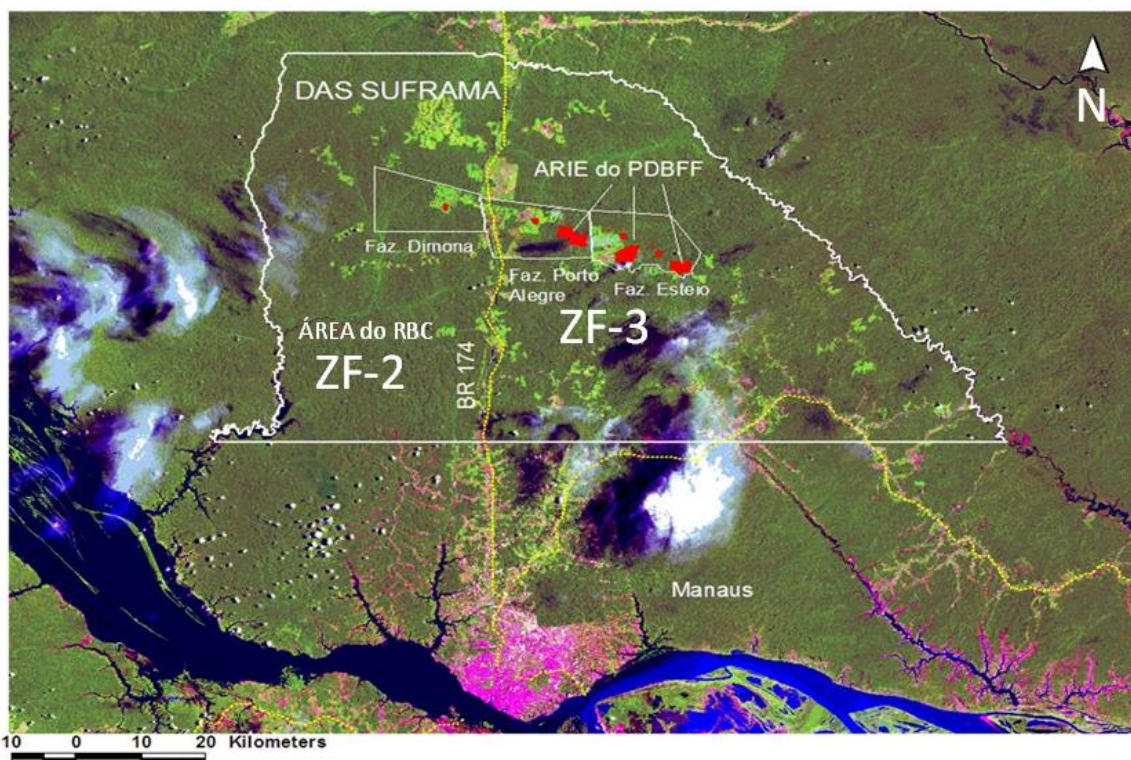


Figura 1. Mapa da Amazônia Central Brasileira, mostrando a localização das Estações Experimentais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas, Brasil. As setas indicam os locais onde houve a provável infecção humana de LTA por *Leishmania (Viannia) naiffi* de acordo com a informação dos pacientes.

Fonte: <http://pdbff.inpa.gov.br/download/mapimg/regmanauspdbff.jpg>.

RESULTADOS

Doze cepas isoladas de pacientes suspeitos para LTA, oriundos dos Estados do Amazonas (10), Pará (01) e Rondônia (01), foram identificadas por eletroforese de isoenzimas como *L. (V.) naiffi*. Um dos pacientes do Amazonas se reinfectou após um

ano da primeira infecção (registros MHOM/BR/2009/IM5549 e MHOM/BR/2010/6032). Devido a este fato, serão consideradas 12 infecções distintas em um total de 11 pacientes (Tab).

Os pacientes apresentaram lesões de pequena proporção, variando entre 1,0 x 1,0mm e 13,5 x 11,5mm (Fig2, Tab1). Nas 12 infecções, o número de lesões se distribuiu da seguinte forma: sete (58,3%) apresentaram apenas uma lesão, quatro (33,3%) apresentaram duas lesões e uma (8,3%) apresentou três lesões; sendo que em sua maioria (75%), as lesões apresentavam-se ulceradas. Em relação à distribuição das lesões, 50% das infecções foram em membro inferior (06), 8,3% em região abdominal (01), 33,3% em membro superior (04) e 8,3% em membro superior e costas (01). O tempo de evolução da doença variou entre um e dez meses. Das 12 infecções, dez (83,3%) foram em homens e apenas duas em mulheres (16,7%) [Tab].

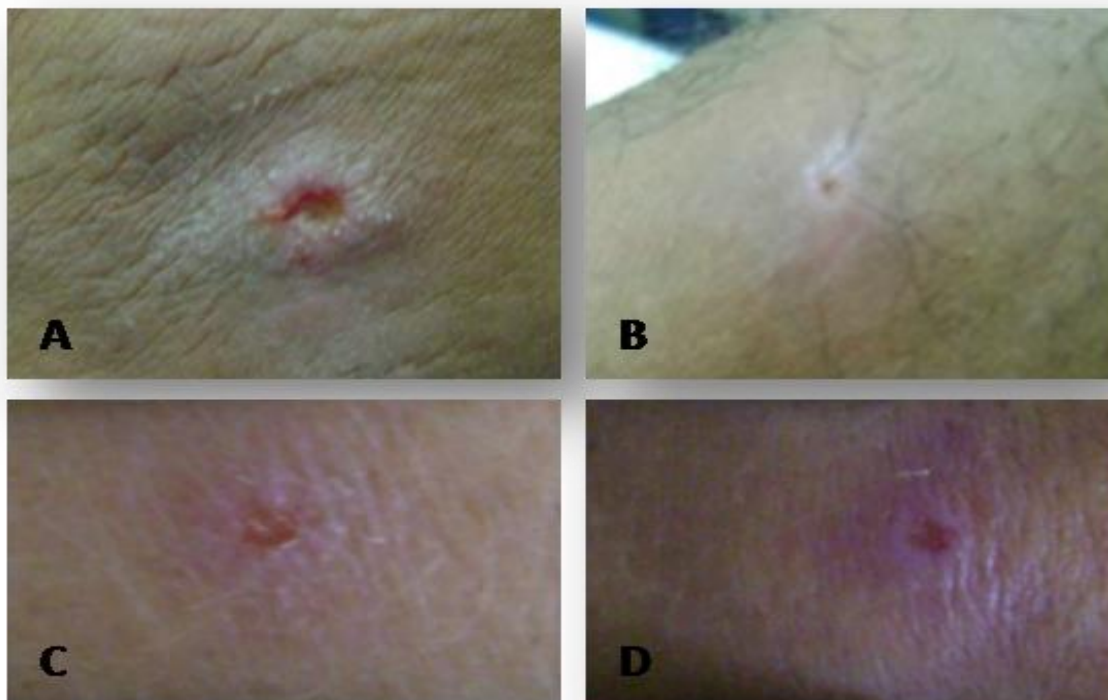


Figura 2. Lesões ulceradas papulosas de pacientes com Leishmaniose cutânea infectados por *Leishmania (V.) naiffi*. A-B: isolados MHOM/BR/2010/IM5665; C-D: MHOM/BR/2009/IM5662.

Das doze cepas, cinco (41,7%) foram isoladas de pacientes que relataram durante a anamnese terem contraído a infecção em Estações Experimentais do INPA durante suas atividades de pesquisa. Duas, das cinco cepas, foram isoladas de um mesmo paciente que se reinfectou na mesma área um ano após ter contraído a primeira infecção (MHOM/BR/2009/IM5549 e MHOM/BR/2010/6032) [Tab].

Tabela. Características clínica/epidemiológicas de pacientes infectados com *Leishmania (Viannia) naiffi*.

Código Internacional ^a	Origem Geográfica	Idade (anos)	Sexo	Número de lesões	Tempo de evolução (meses)	Local da lesão	Tamanho da lesão (mm)	Característica da lesão
MHOM/BR/1992/IM3829	RO	35	M	01	10	Perna	10 x 14	Ulcerada
MHOM/BR/1993/IM3936	AM	40	M	02	09	Perna	10,5 x 10,5 e 13,5 x 11,5	Ulceradas
MHOM/BR/1993/IM4000	AM / ZF2	30	M	01	06	Abdome	7,3 x 7,3	Nodular
MHOM/BR/1996/IM4315	AM	40	M	01	02	Perna	12,5 x 12,5	Ulcerada
MHOM/BR/1997/IM4366	AM	59	M	01	03	Braço	10 x 10	Ulcerada
MHOM/BR/2006/IM5333	AM	21	F	02	01	Perna	3,1 x 2,4 e 2,6 x 2,2	Papulosa
MHOM/BR/2009/IM5549	AM /ZF3, km 41	31	M	01	04	Braço	3 x 4	Ulcerada
MHOM/BR/2009/IM5553	ZF3 /Esteio	34	M	01	04	Braço	ND	Ulcerada
MHOM/BR/2009/IM5557	PA	27	F	02	09	Braço e Antebraço	3x3	ND
MHOM/BR/2009/IM5562	AM/ZF2/EEST	26	M	02	04	Braço e costas	1,0 x1,0 (Braço) e 2,0 x 2,0 (Costas)	Ulceradas
MHOM/BR/2010/IM5665	AM	23	M	03	01	Perna	8x6 (maior)	Ulceradas
MHOM/BR/2011/IM6032	AM/ZF3, Km 37	32	M	01	01	Perna	8x12	Ulcerada

a: designação: hospedeiros [M = Mammalia; HOM: *Homo sapiens*/país de origem/ano de isolamento/código de origem. BR: Brasil; RO: Rondônia; AM: Amazonas; PA; Pará. EEST- Estação Experimental de Sicultura Tropical; ND.: Não definida

Foram capturadas e dissecadas nas Estações Experimentais Porto Alegre e Esteio, um total de 166 fêmeas de flebotomíneos distribuídas em 13 espécies, sendo a espécie *L. olmeca nociva* a mais numerosa com 48 (28,9%) indivíduos capturados, seguida de *L. flaviscutellata* (25/15,1%), *L. rorotaensis* (15/9%), *L. trichopyga* (13/7,8%), *L. georgii* (12/7,2%), *L. davisi* (12/7,2%), *L. ruii* (9/5,4%), *L. squamiventris squamiventris* (8/4,8%), *L. ayrozai* (8/4,8%), *L. umbratilis* (7/4,2%), *L. anduzei* (4/2,4%), *L. sordellii* (3/1,8%) e *L. monstrosa* (2/1,2%). Das fêmeas analisadas, nenhuma apresentou infecção natural por tripanosomatídeos (Fig 3).

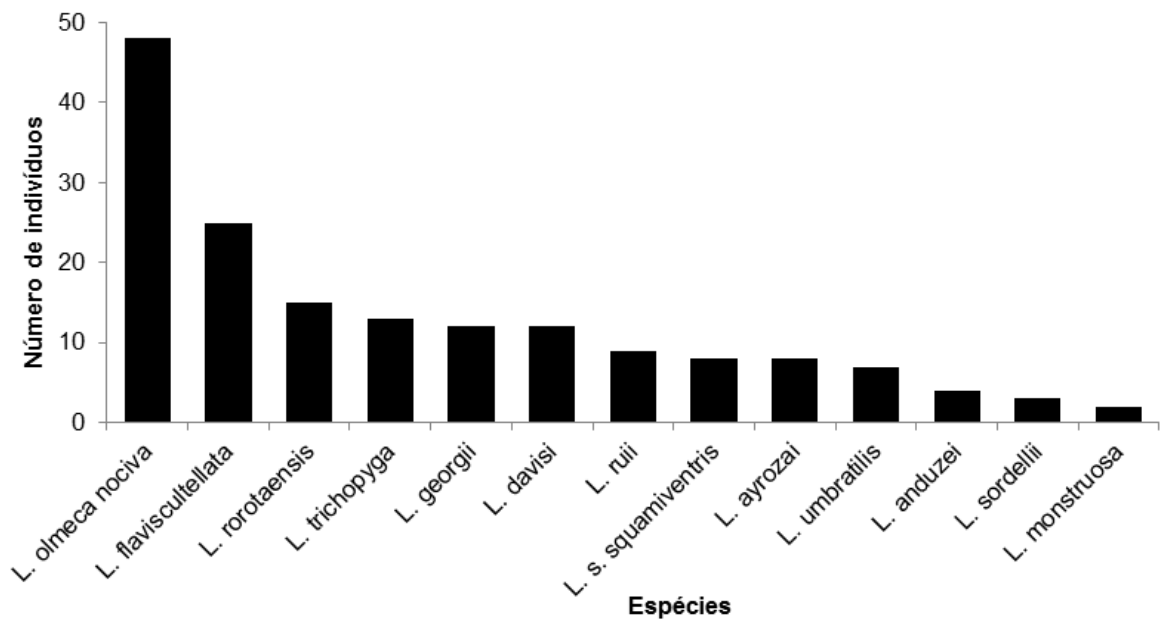


Figura 3. Espécies de flebotomíneos (*Lutzomyia* spp.) capturados e dissecados nas Estações Experimentais Porto Alegre e Esteio (Reserva Florestal ZF3), Manaus – Amazonas.

DISCUSSÃO

Atualmente, poucos casos de LTA ocasionados por *L. (V.) naiffi* foram descritos. Menos de 15 casos da doença haviam sido registrados no Brasil até o ano de 2010 (LAINSON et al., 1990; GRIMALDI et al., 1991; NAIFF et al., 1991; TOJAL et al., 2006; FIGUEIRA et al., 2008). Em 2010, Coelho et al. identificaram nove isolados de pacientes com LTA como *L. (V.) naiffi* no estado do Amazonas, num total de 209 cepas. Também foram identificadas neste total, 15 infecções mistas envolvendo esta espécie com *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

No presente trabalho, foram identificados 12 novos casos de LTA ocasionados por *L. (V.) naiffi* na região norte do Brasil, sendo que destes, cinco foram oriundos de Estações Experimentais do INPA localizadas nas Reservas Florestais ZF2 e ZF3 (três infecções ocorreram na ZF3 e duas na ZF2). Estas são áreas utilizadas em pesquisas experimentais por pesquisadores e por estudantes de diversos cursos de pós-graduação e parecem representar um papel importante como novo foco de LTA na região. Em 2008, Figueira et al. identificou cinco cepas isoladas de *L. (V.) naiffi*. Dentre elas, três foram obtidas de pacientes que se infectaram em área das Estações Experimentais ou em suas proximidades. Duas foram isoladas de estudantes de pós-graduação do INPA que se infectaram na Reserva Esteio e na Fazenda Porto Alegre, ambas na ZF3; e um terceiro paciente se infectou na BR 174, Km 21.

Apesar da espécie *L. ayrozai* não ser considerada altamente antropofílica no estado do Pará (LAINSON et al., 1994; LAINSON; SHAW, 1998), a maioria das infecções por *L. (V.) naiffi* foi encontrada nesta espécie de vetor. Em regiões do Sudeste do país, essa espécie de flebotomíneo é considerada altamente antropofílica (AGUIAR; SOUCASAUX, 1984), como na Serra dos Órgãos, no estado do Rio de Janeiro (AGUIAR et al., 1985) e no Vale do Ribeira no estado de São Paulo (GOMES; GALATI, 1989).

Destaca-se ainda o registro de *L. (V.) naiffi*, isolada pela primeira vez de um paciente (MHOM/BR/1992/IM3829) que relatou ter contraído a infecção em Rolim de Moura, Rondônia (Tab). Conclui-se então que, além do Amazonas e Pará, *L. (V.) naiffi* também foi isolada de paciente infectado no Estado de Rondônia, fato até então ainda não notificado. Esta espécie já havia sido isolada do tatu *Dasypus novemcinctus* (NAIFF et al., 1991) e de *Psychodopygus hirsutus* e *L. davisii* neste mesmo Estado (GIL et al., 2003).

Os animais de laboratório nos quais foram inoculadas as cepas isoladas dos pacientes não apresentaram lesões cutâneas evidentes durante um período de observação de mais de seis meses. No entanto, o parasito pode ser reisolado em cultura até um ano após inoculação. Este fato dificulta o diagnóstico da leishmaniose quando apenas o isolamento é obtido através do inóculo em hamster. Fato este também observado por Lainson & Shaw (2005) que se referem à ausência de lesões cutâneas produzidas na pele de hamster (*Mesocricetus auratus*) ou apenas a presença de nódulos muito discretos contendo poucas amastigotas.

A observação do baixo grau de infectividade de *L. (V.) naiffi* em macrófagos de camundongos BALB/c, a baixa frequência de infecção e grau de patogenicidade ao homem, sugerem que esta espécie também possa produzir uma infecção benigna e oculta na pele humana e que, a transmissão em decorrência desses fatos, seja mais frequente do que se observa (CAMPOS et al., 2008). Situação aplicável a pessoas que vivem em regiões isoladas da Amazônia. Talvez o fato das lesões não apresentarem uma progressão de tamanho seja um parâmetro para a demora na busca de diagnóstico e conseqüentemente tratamento da doença.

A espécie *L.(V.) naiffi* já foi e provavelmente ainda será registrada em outras partes da América Latina, onde o mamífero reservatório e os vetores coexistem (LAINSON, 2010). No Panamá, o parasito foi detectado em *L. trapidoi* e *L. gomezi* (AZPURUA et al., 2010), e no Brasil, no estado do Acre, foi isolado de um paciente um híbrido de *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lainsoni* (TOJAL DA SILVA, et al., 2006).

Considerando as notificações de casos de LTA por *L. (V.) naiffi* nas Estações Experimentais do INPA, bem como as espécies transmissoras identificadas como *L. squamiventris*, *L. davisii* e *L. ayrozai* nas Estações Porto Alegre e Esteio, localizadas na Reserva Florestal ZF3 e o levantamento de flebotomíneos realizado por Dias-Lima, Castellón e Sherlock (2002) na Estação Experimental de Silvicultura Tropical localizada na ZF2, onde foram identificadas as espécies *L. squamiventris*, *L. davisii*, *L. ayrozai* e *L. paraensis*, esta também incriminada como vetor de *L. (V.) naiffi*, sugerimos que estas áreas sejam áreas de foco dessa espécie de parasito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, G.M.; SOUCASAUX, T. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. I - Frequência mensal em isca humana (Diptera, Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1984, 79: 197- 209.

AGUIAR, G.M.; VILELA, M.L.; SCHUBACK, P.D.; SOUCASAUX, T.; AZEVEDO, A.C.R. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. IV — Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1985, 80: 465-482.

ARIAS, J.R.; FREITAS, R.A. Sobre os vetores de leishmaniose cutânea na Amazônia central do Brasil. 2: Incidência de flagelados em flebótomos selváticos. **Acta Amazônica**. 1978, 8: 387-396.

AZPURUA, J.; DE, L.C.D.; VALDERAMA, A.; WINDSOR, D. Lutzomyias and fly diversity and rates of infection by Wolbachia and an exotic Leishmania species on Barro Colorado Island, Panama. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 2010, 4: e 627.

CAMPOS, M. B.; DE CASTRO GOMES, C. M.; DE SOUZA, A. A.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.; SILVEIRA, F.T. In vitro infectivity of species of *Leishmania* (Viannia) responsible for American cutaneous leishmaniasis. **Parasitology Research**. 2008, 103: 771–6.

COELHO, L.I.C.; PAES, M.; GUERRA, J.A.; BARBOSA, M.G.; COELHO,; LIMA, B.; BRITO, M.E.; BRANDÃO FILHO, S. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology Research**. 2010, 108: 671-677.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G. Jr.; MOMEN, H. A general classification of the New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 1994, 50:296-311.

DIAS-LIMA, A.G.; CASTELLÓN, E.G.; SHERLOCK, I. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da Estação Experimental de Silvicultura Tropical, Estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**. 2003; 33: 303-316.

DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; CUPOLLILLO, E.; CASTRO, A. C. C.; ALVES, T. P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2006, 39 (1): 43-46.

FIGUEIRA, L. P.; ZANOTTI, M.; PINHEIRO, F.G.; FRANCO, A. M. R. Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2008, 41 (5): 512-514.

FOUQUE, F.; GABORIT, P.; ISSALY, J.; CARINCI, R.; GANTIER, J. C.; RAVEL, C.; DEDET, J. P. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with changing patterns in the transmission of the human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2007, 102: 35-40.

GIL, L. H. S.; BASANO, S. A.; SOUZA, A. A.; SILVA, M. G. S.; BARATA, I.; ISHIKAWA, E. A.; CAMARGO, L. M. A.; SHAW, J. J. Recent Observations on the Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the Importance of *Psychodopygus davisias* a Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2003, 98(6): 751-755.

GOMES A. C.; GALATI E. A. C. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7- Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do sistema de Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Saúde Pública**. 1989, 23 (2): 136-42.

GRIMALDI JR. G.; MOMEN, H.; NAIFF, R. D.; MCMAHON-PRATT, D.; BARRETT, T. V. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 1991, 44: 645-661.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saude**. 2010, 1 (2): 13-32.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmania (Viannia) naiffi sp. N., a parasite of the armadillo, *Dasyus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Annals Parasitology Human**. 1989, 64: 3-6.

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

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* Species. In FEG Cox, JP Kreier, DWakelin (eds), **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, Parasitology. 1998, 9 (5): 242-266,

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; SOUZA, A.A.A.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A.Y. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1994, 89: 435-443.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.** 1990, 65:282–284.

NAIFF, R. D.; FREITAS, R.A.; NAIFF, M.F.; ARIAS, J. R.; BARRETT, T. V.; MOMEN, H.; GRIMALDI JR., G. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 1991, 86: 317–21.

NICOLE, G.L. Culture du parasite Du Bouton d'Orient. **C.R Acad Sci**. 1908, 146: 842-843, 1908.

NOVY, F.G.E.; MACNEAL, W. J. On the cultivation of *Trypanosome brucei*. **Journal Infectious Diseases**. 1904, 1: 1-30.

PRATLONG, F.; DENIAU, M.; DARIE, H.; EICHENLAUB, S.; PROLL, S., GARRABE, E.; GUYADEC, T.; DEDET, J. P. Human cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania naiffi* is wide-spread in south America. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**. 2002: 781-785.

SILVEIRA, F.T.; ISHIKAWA, E.A.; DE SOUZA, A.A.; LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**. 2002, 9(1):43-50.

TOJAL DA SILVA, A.C.; CUPOLILLO, E.; VOLPINI, A.C.; ALMEIDA, R.; ROMERO, G.A. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Tropical Medicine & Internacional Health**. 2006, 11: 1388 – 1398.

VAN THIEL, P.P.A.M.; VAN GOOL, T.; KAGER, P.A.; BART, A. First Cases of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) naiffi* Infection in Surinam. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 2010, 82: 588–590.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* and flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memorian American Entomology Institute**. 1994, 54, 1–88.

6. CAPÍTULO III

**Análise de proteínas do plasma de pacientes com leishmaniose cutânea por eletroforese
bidimensional**

Análise de proteínas do plasma de pacientes com leishmaniose cutânea por eletroforese bidimensional

Luanda P. Figueira¹, Liliane C. da Rocha¹, Fabiane V. Soares¹, Alana V. da Silva¹, Maricleide de F. Naiff¹, Shárala Kumari², Luís H. M. Gomes¹, Flávia Regina A. C. N. Moreira² e Antonia Maria R. Franco¹

1. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.
2. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.

Fonte de financiamento: FAPEAM

Endereço para correspondência: Dra. Antonia Maria Ramos Franco. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Av. André Araújo, 2.936 - Petrópolis - CEP 69060-001 - Manaus - AM, Brasil.

E-mail: afranco@inpa.gov.br

RESUMO

A combinação da técnica de eletroforese 2-DE com a espectrometria de massas ESI-QToF para análise das proteínas do plasma de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis* antes e após tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®) permitiu a identificação de proteínas diferencialmente expressas em comparação com as do plasma de indivíduos não infectados. Com base nos valores relacionados à intensidade dos *spots*, verificou-se que nos pacientes infectados foi observada maior expressão proteica da Isoforma 1 do fator B e Isoforma 1 do fator H da via alternativa do Complemento, da Proteína relacionada à Haptoglobina (HPR) e da Cadeia alfa do Fibrinogênio, e uma menor expressão da Serotransferrina. Foi variada a expressão dos *spots* dessas proteínas nas amostras de plasma analisadas no pós-tratamento. Essas proteínas são conhecidas como sendo de fase aguda de infecção e estão envolvidas no processo inflamatório, necessárias para a homeostasia do organismo. O envolvimento e função dessas proteínas no processo de infecção por *L. (V.) guyanensis* necessita ser melhor investigado.

DESCRITORES: Leishmaniose cutânea. *Leishmania (V.) guyanensis*. Proteoma

ABSTRACT

The combination of electrophoresis technique 2-DE with ESI-QToF mass spectrometry for analysis of plasma proteins of patients infected by *Leishmania (V.) guyanensis* before and after treatment with pentavalent antimony (Glucantime®) allowed the identification of proteins differentially expressed in comparison with the plasma of uninfected individuals. Based on the values related to the intensity of the spots, it was found that in infected patients there was greater expression of isoform 1 protein factor B and isoform 1 factor H alternative pathway of complement, haptoglobin-related protein (HPR) and fibrinogen alpha chain; a lower expression of Serotransferrina was observed. Was varied spots expression of these proteins in the plasma samples analyzed after treatment. These proteins are known as the acute phase of infection and are involved in the inflammatory process necessary for the homeostasis of the organism. The involvement and role of these proteins in the process of infection by *L. (V.) guyanensis* needs to be further investigated.

KEYWORDS: cutaneous leishmaniasis. *Leishmania (V.) guyanensis*. proteome

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) representa um conjunto de doenças com características clínicas, imunológicas e patológicas distintas, cuja expressão depende de fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasito, incluindo a natureza da espécie de *Leishmania* infectante e fatores genéticos do hospedeiro. Muitos destes parasitos são capazes de produzir um espectro de doença no lugar de uma única forma clínica no hospedeiro humano (RODRIGUEZ-BONFANTE et al., 2003; FARIA et al., 2005; GUIMARÃES et al., 2005; SILVEIRA et al., 2004; 2009).

O estado do Amazonas é uma região endêmica para LTA. Em 2011, apresentou uma incidência de aproximadamente 64,5 casos por 100.000 habitantes (SINAN, 2012). São cinco as espécies relacionadas à infecção neste estado: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lansonii* e *L. (V.) guyanensis*, sendo a última a espécie mais prevalente, contribuindo com mais de 80% dos casos (NAIFF, 1998; ROMERO et al., 2001; 2002; FIGUEIRA et al., 2008; COELHO et al., 2010; CHRUSCIAK-TALHARI et al., 2011; GUERRA et al., 2011). Além da forma cutânea, *L. (V.) guyanensis* pode causar, em menor frequência, a forma mucosa ao homem (NAIFF et al., 1988; GRIMALDI et al., 1991, NAIFF, 1998).

Atualmente, o controle da doença baseia-se na quimioterapia, uma vez que vacinas contra o parasito ainda estão em desenvolvimento (PALATNIK-DE-SOUSA, 2008; CHARMOY et al., 2010). O tratamento de primeira escolha contra a leishmaniose é o antimonial pentavalente (BERMAN, 1988; RATH et al., 2003), cuja eficiência tem sido comprometida pelo desenvolvimento natural de resistência dos parasitos (CROFT et al., 2006). Fato este também comprovado em pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis*,

havendo necessidade de uma revisão cuidadosa do tratamento indicado (ROMERO et al., 2001; NEVES, 2010).

O melhor conhecimento da fisiopatologia das doenças tem permitido a identificação de marcadores genéticos, bioquímicos e imunológicos que contribuem não só para o diagnóstico, mas também para a compreensão da atividade e da remissão dos processos patológicos (SCHRIEFER; CARVALHO, 2008). Nos últimos anos, muitas questões biológicas importantes têm sido respondidas pela proteômica. Utilizando-se essa metodologia, varios candidatos a biomarcadores foram descobertos (BARBOSA et al., 2012).

O estudo das proteínas do plasma humano é um dos caminhos para a busca destes marcadores, pois seu proteoma é suscetível de conter, se não todas, quase todas as proteínas humanas; bem como numa infecção, proteínas derivadas de diversos microrganismos (ANDERSON et al., 2002; 2004).

A identificação de marcadores proteicos da infecção na LTA tem importância tanto para o diagnóstico, confirmação da cura da doença, como também para a busca de alternativas de tratamento e vacinas. Para isto, o uso da tecnologia proteômica pode ajudar na identificação mais rápida de novas proteínas, na avaliação de seu padrão de expressão e de suas funções (CUNNINGHAM; 2000). A combinação da técnica de eletroforese bidimensional com as técnicas de espectrometria de massas tornou-se uma das melhores estratégias disponíveis para a identificação em larga escala do conjunto de proteínas resultantes da expressão gênica (MANN et al., 2001; NYMAN, 2001).

Assim, neste estudo, foram analisadas as proteínas do plasma de pacientes infectados com *L. (V.) guyanensis* antes e após o tratamento com antimonial pentavalente, utilizando análise proteômica.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e grupo controle: Foram utilizadas amostras de plasma de 10 pacientes (Tab. 01) adultos (com idade entre 18 e 58 anos), de ambos os sexos (1:1), com Leishmaniose Cutânea (LC), primeira infecção, por parasitos identificados como *L. (V.) guyanensis*, provenientes dos municípios de Manaus e Rio Preto da Eva, AM. Os plasmas foram obtidos antes (no momento do diagnóstico) e pós-tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®), após confirmação de cura clínica (com lesão cicatricial).

Os isolados de *Leishmania* dos pacientes foram identificados como *L. (V.) guyanensis* por eletroforese de isoenzimas de acordo com protocolo descrito por Cupolillo et al., (1994), utilizando oito sistemas enzimáticos: Malato Desidrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37), Isocitrato Desidrogenase (IDH, E.C.1.1.1.42) com substrato NAD e NADP, Enzima Málica (ME, E.C.1.1.1.40), Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH, E.C.1.1.1.44), Aconitato Hidratase (ACON, E.C.4.2.1.3) e Hexoquinase (HK, E.C.2.7.1.1).

Também foram utilizados plasmas de cinco doadores voluntários (grupo controle/Tab. 02), de ambos os sexos e mesma faixa etária dos pacientes, oriundos de região endêmica para LTA, mas sem histórico de contato com o parasito.

Todos os pacientes, assim como os controles, apresentaram sorologia negativa para testes imunológicos de HIV, Hepatite C e Doença de Chagas. Os doadores voluntários foram negativos para detecção de anticorpos IgG e IgM específicos para Leishmaniose. Todos os pacientes aceitaram participar do estudo e da utilização de uso de sua amostra de plasma, com o trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (no. 193/08).

De acordo com recomendação do Ministério da Saúde, a administração do Glucantime® foi por via intramuscular ou endovenosa, sendo a dose calculada de acordo com o peso corporal (10 a 20mg de antimonial pentavalente/Kg por dia). Cada série de tratamento teve duração de vinte dias seguidos. Na tabela 01, constam dados referentes à doença e tratamento dos pacientes.

Amostras de plasma: Para obtenção de plasma, foram coletados 04 mL de sangue periférico em tubos vacutainer (BD Vacutainer™, Juiz de Fora, MG, Brasil) com solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). As amostras de sangue foram condicionadas no gelo após coleta e centrifugadas a 800 x g, por 15 minutos a 4°C, o plasma foi aliquoteado e estocado a -80°C até ser analisado.

Tabela 1. Dados referentes à doença, ao tratamento e coleta de plasma dos pacientes com Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* provenientes dos municípios de Manaus e Rio Preto da Eva, AM, Brasil, entre 2008 e 2011.

Código da amostra ^a	Idade (anos)	Evolução da doença (dias)	Nº de lesões	Tamanho da lesão (mm)	Nº de séries de Antimonial	Intervalo de tempo após cura clínica ^b
MHOM/BR/08/IM5515	55	20	07	30 x 20	01	07 meses
MHOM/BR/08/IM5520	53	60	05	30 x 16	03	07 meses
MHOM/BR/09/IM5595	21	30	01	12 x 15	02	04 meses
MHOM/BR/10/IM5637	30	60	01	17 x 18	01	40 dias
MHOM/BR/10/IM5653	18	90	01	30 x 20	03	04 meses
MHOM/BR/10/IM5690	58	60	01	15 x 12	01	50 dias
MHOM/BR/10/IM5692	30	15	02	60 x 60	02	03 meses
MHOM/BR/10/IM5696	25	21	01	27 x 27	02	03 meses
MHOM/BR/11/IM5775	24	21	04	08 x 05	02	03 meses
MHOM/BR/11/IM5874	23	120	01	18 x 14	01	07 meses

^aDesignação: hospedeiros[M=Mammalia; HOM: *Homo sapiens*/país de origem/ano de isolamento/código de origem]; ^bcoleta de sangue após cura clínica.

Tabela 2. Características de indivíduos do grupo controle provenientes de Manaus, AM, Brasil.

Código da amostra ^a	Sexo	Idade (anos)
MHOM/BR/10/IM5588	M	24
MHOM/BR/10/IM5589	M	24
MHOM/BR/10/IM5685	M	19
MHOM/BR/10/IM5590	F	47
MHOM/BR/10/IM5591	F	50

a: designação: hospedeiros [M=Mammalia; HOM: *Homo sapiens*/país de origem/ano de isolamento/código de origem]; M-Masculino; F-Feminino

Depleção de IgG e albumina do plasma: Foram removidas duas proteínas abundantes no plasma, IgG e albumina, utilizando a coluna Hitrap Albumin & IgG Depletion (GE Healthcare) no equipamento ÄKTA purifier UPC 900 (GE Healthcare). Após a remoção, as amostras foram dialisadas com água Milli-Q e a precipitação proteica realizada com acetona. Quatro volumes de acetona gelada foram adicionados ao plasma após a remoção de IgG e Albumina e a amostra foi incubada por no mínimo duas horas a -20°C. Em seguida, o material foi centrifugado a 22000 x g por uma hora a 4°C e ressuspensão em água Milli-Q e armazenado em menos 80°C.

Eletroforese bidimensional (2D-PAGE): A focalização isoeétrica (FI) para a técnica 2D foi realizada usando o aparato IPGphor (Ettan IPGPhor 3/GE Healthcare). Alíquotas de proteína (50 µL de plasma em 50µL de água Milli-Q) foram diluídas em um volume final de 250µL em solução de reidratação (*DeStreak™ rehydration solution*/GE Healthcare) com 0,5% de tampão IPG pH 3-10NL. As amostras foram aplicadas nas fitas com gradiente de pH imobilizado-IPG (13-cm pH 3-10 NL/GE Healthcare) para reidratação no gel de forma gradual, conforme HAUDEK et al. (2008): (1h, 0-500V linear; 5h, 500V; 5h, 500-3500V linear; 12h, 3500V). Após a focalização, as fitas foram equilibradas durante 15 minutos, em tampão de equilíbrio (50mM Tris-HCl pH 8,8, uréia 6M, 30% glicerol, 2% SDS,

0.002% de azul de bromofenol) contendo 125 mM de DTT e, em seguida, durante 15 minutos no mesmo tampão contendo 125 mM de iodoacetamida. Após equilíbrio das fitas, a segunda dimensão foi realizada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) nas seguintes condições: 600V, 30mA por gel, 30W por 30 minutos e em seguida: 600V, 40mA por gel, 30W por 4 horas. Os géis foram então fixados em solução contendo 40% etanol e 10% de ácido acético por 30 minutos. Posteriormente, foram corados com “Comassie Brilliant Blue colloidal por sete dias. Para revelação dos *spots*, os géis foram descorados com água destilada durante três dias.

Análise de imagens bidimensionais: Após a coloração, os mapas proteicos foram documentados e as imagens analisadas utilizando-se o aparelho ImageScanner III (GE Healthcare). Foram criados géis consenso a partir de três replicatas do gel por condição estabelecida. A análise dos *spots* foi realizada pelo programa ImageMaster™ 2D Platinum v6.0.

Para a análise diferencial dos *spots* proteicos, dois grupos foram analisados. Cada grupo foi formado por plasma de um controle, um paciente AT e um paciente PT. O primeiro grupo do sexo masculino e o segundo grupo do sexo feminino (Tab. 03).

Os pontos que apresentaram a diferença de pelo menos duas vezes na intensidade foram considerados como proteínas/peptídeos diferencialmente expressos. A análise diferencial foi realizada comparando-se a quantidade, presença ou ausência de *spots* em cada condição (plasma de doadores saudáveis x pacientes antes x pós- tratamento).

O número de *spots* diferenciais selecionados para remoção em cada um dos géis consensos, nos dois grupos, consta na tabela 03.

Tabela 3. Dados referentes aos géis selecionados para sequenciamento por espectrometria de massas ESI-QToF (Electrospray Ionization).

Gel	Código da amostra ^a	Número de <i>spots</i> selecionados	Sexo	Condição	Grupo
A	MHOM/BR/10/IM5590	62	F	Controle	01
B	MHOM/BR/10/IM5685	19	M	Controle	02
C	MHOM/BR/10/IM5637	115	F	A T	01
D	MHOM/BR/10/IM5696	67	F	P T	01
E	MHOM/BR/08/IM5520	146	M	P T	02
F	MHOM/BR/11/IM5775	133	M	A T	02

^aDesignação: hospedeiros[M=Mammalia: HOM: *Homo sapiens*/país de origem/ano de isolamento/código de origem]; AT- Antes do Tratamento e PT- Pós Tratamento

Digestão e identificação de proteínas por espectrometria de massas (Electrospray Ionization): Os *spots* diferenciais foram selecionados, excisados manualmente e submetidos à digestão em gel com tripsina conforme protocolo modificado, descrito por Shevchenko et al. (1996).

Uma alíquota (4,5 µL) da mistura obtida após a digestão foi separada em resina C18 (75µm 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 minutos. O instrumento foi operado no modo 'top three', no qual um espectro MS foi 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 carbamido metilação 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.

Análises estatísticas: As análises estatísticas foram realizadas a partir das intensidades dos *spots* das proteínas diferenciais utilizando-se o software *GraphPad Prism 5.0* (San Diego, CA, EUA). Todos os dados foram considerados como apresentando uma distribuição não paramétrica, e, portanto, as análises comparativas entre os grupos foram realizadas por meio da análise de variância ANOVA seguido pelo teste de *Kruskal-Wallis* e *Mann Whitney*. A significância estatística foi definida em ambos os casos em $p < 0,05$.

A intensidade de um spot fornece informações quantitativas a respeito da expressão diferencial de proteínas em um estudo comparativo (ASHTON et al., 2001)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 542 *spots* selecionados nos géis consensos, 479 foram analisados por espectrometria de massas. O sequenciamento por ESI-Q Tof resultou na identificação de 52 proteínas e 17 isoformas que foram agrupadas de acordo com as suas categorias funcionais. Deste total, 29 (42%) são proteínas de defesa, 15 (21,7%) de transporte, 18 (27,5%) de regulação, 03 (4%) estruturais e 03 (4%) que não foram agrupadas (Tab. 4).

No presente estudo, cinco proteínas tiveram suas expressões diferenciadas (anexo) com significância estatística de $p < 0,05$ entre os grupos estudados: Isoforma 1 do fator B do Complemento, Isoforma 1 do fator H do Complemento, Proteína relacionada a Haptoglobina (HPR), Serotransferrina e Cadeia alfa do Fibrinogênio (Fig. 01 e 02). Estas proteínas apareceram em diferentes spots, com variações em suas massas moleculares e em seus pontos isoelétricos, isto provavelmente é resultado de modificações pós-traducionais (Fig. 02).

A seguir descrição e função das proteínas/peptídeos sequenciadas que foram diferencialmente expressas no plasma e apresentaram maior significância estatística em dois

momentos na infecção ativa em pacientes com *L. (V.) guyanensis* e de pacientes clinicamente curados após tratamento com antimonial pentavalente:

a) Isoforma 1 do Fator B do Complemento e Isoforma 1 do Fator H do Complemento- Os níveis de dois componentes da via alternativa do Complemento, Isoforma 1 do fator B e Isoforma 1 do fator H, foram diferencialmente expressos. A isoforma I do fator B apresentou-se diferenciada entre o grupo controle e pacientes (AT e PT) [p= 0,0057]; e a Isoforma 1 do fator H teve maior intensidade em pacientes AT em relação aos controles (p= 0,0444) [Fig. 01].

O sistema imune inato representa a primeira linha de defesa contra as infecções microbianas, tendo o sistema complemento como um importante mecanismo que resulta na ativação da opsonização do patógeno, produção de anafilatoxinas pró-inflamatórias que recrutam células para o sítio da infecção (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos e algumas células dendríticas), fagocitose e lise (DUNKELBERGER; SONG, 2009; CESTARIA et al, 2013). A ativação da via complemento constitui um elo fundamental entre a resposta imune inata e adquirida (LIMONCU et al., 2011).

O sistema complemento é constituído por mais de 30 proteínas séricas e de membrana associadas, ativadas em cascata, que culminam com a formação de complexo de ataque à membrana (CAM) na superfície do patógeno, causando lise da célula (AMBROSIO; MESSIAS-REASON, 2005; LAMBRIS et al, 2008; CESTARI; RAMIREZ, 2010). São três principais vias de ativação do sistema complemento: a via clássica que é ativada quando IgG e IgM se ligam à superfície do patógeno; a via alternativa que é ativada na ausência de anticorpos quando C3 reage com um grupo hidroxila ou amina na superfície do agente patogênico; e a via da lectina que é semelhante a via clássica, mas ocorre na ausência de anticorpos onde a lectina ligante de manose se liga à manose na superfície do patógeno (CESTARI; RAMIREZ, 2010; GOTO; SANCHEZ, 2013).

Tabela 4. Categorias de processos biológicos de proteínas de plasmas de pacientes infectados por *Leishmania (Viannia) guyanensis* e de doadores voluntários, obtidas em géis 2-DE sequenciadas por espectrometria de massas (ESI-Q Tof) e identificadas no banco de dados NCBI.

CATEGORIAS
Proteínas de transporte
Afamin
Alpha-1-acid glycoprotein 1
Apolipoprotein A-I
Ceruloplasmin
Haptoglobin
Hemoglobin subunit beta
Isoform 2 of Serum albumin
Retinol-binding protein 4
Transthyretin
Vitamin D-binding protein isoform 1
Hemoglobin subunit alpha
Hemopexin
HPR 31 kDa protein
Isoform 1 of Haptoglobin-related protein
Serotransferrin
Proteínas de defesa
Alpha-2-macroglobulin
Complement C3-like, partial
Complement C4-A
Complement component C6 precursor
Complement component C9
Complement factor B
Complement factor I
Fibrinogen beta chain
Fibrinogen beta chain isoform 2 preproprotein
Highly similar to Complement factor B
Highly similar to Homo sapiens
Highly similar to Protein Tro alpha1
IGK@ protein
IGL@ protein
Isoform 1 of Complement factor H
Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain
Isoform 2 of Complement factor B (Fragment)
Isoform 2 of Ig mu chain C region
Isoform Gamma-B of Fibrinogen gamma chain
Neuroblastoma of Homo sapiens

Protein (SNC73) mRNA

*Continuação..***Proteínas de defesa**

SNC66 protein
 Zinc-alpha-2-glycoprotein
 Beta-2-glycoprotein 1
 Complement C3 (Fragment)
 Ig mu heavy chain disease protein
 Isoform 1 of Complement factor B (Fragment)
 Myeloma
 Plasminogen

Enzimas

Carbonic anhydrase 2

Proteínas reguladoras

64 kDa protein
 Alpha-1-antitrypsin null variant (Fragment)
 Antithrombin-III
 Highly similar to ALPHA-1-ANTICHYMOTRYPSIN
 Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin
 Isoform 1 of Clusterin
 Isoform 2 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
 Isoform 2 of Pre-mRNA-processing factor 39
 Isoform HMW of Kininogen-1
 Leucine-rich alpha-2-glycoprotein
 Ribosomal protein S6 kinase alpha-3
 Serum amyloid P-component
 Transcription factor (Fragment)
 Vitronectin
 Inter-alpha (Globulin) inhibitor H2, isoform CRA_a
 Isoform 2 of Bromo adjacent homology domain-containing 1 protein
 Pigment epithelium-derived fator
 Plasma protease C1 inhibitor

Função estrutural

Isoform 1 of Gelsolin
 Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain
 Cytoplasmic 2

Processo biológico desconhecido

Highly similar to Alpha-2-HS-glycoprotein
 Isoform 1 of Alpha-1B-glycoprotein
 13 kDa protein

As três vias com as respectivas C3 convertases convergem para promover a clivagem do C3 em C3a (fator quimiotático) e C3b. C3b liga-se a C3 convertase, em seguida, forma a C5 convertase que cliva C5, gerando C5a (factor quimiotático) e fragmentos de C5b. O fragmento C5b inicia a montagem dos componentes C6, C7, C8 e C9 resultando na formação do complexo de ataque à membrana (CAM) C5b-C6-C7-C8-C9 (GOTO; SANCHEZ, 2013).

A via alternativa é filogeneticamente a mais antiga e mais importante via de ativação do complemento e que proporciona um mecanismo de defesa altamente eficiente contra a invasão de microrganismos (ZIPFEL, 2001). É iniciada pela hidrólise espontânea de C3, com formação de C3b solúvel (C3b-H₂O), que se liga ao fator B. Uma vez associados, o complexo C3b-H₂O-B é clivado pela serino-protease fator D, que cliva o fator B, formando C3b-H₂O-Bb solúvel. Este produto possui baixa atividade, mas é capaz de ativar vagarosamente outras moléculas de C3.

Se a molécula de C3b se liga a alguma célula do organismo, ela acaba sendo inativada e ao se ligar a uma superfície estranha, ela continuará ativa e será capaz de receber moléculas do fator B que é imediatamente ativado a Bb formando C3bBb (DUNKELBERGER, SONG, 2010). Com a ligação de mais uma molécula de C3b ao lado do complexo, forma-se a C5 convertase (C3bBb3b), que é eficaz na ativação de C5 (BANDA et al., 2010). Este processo culmina na formação do CAM. Esta via pode ser amplificada ou inibida através da ligação de properdina ou fator H, respectivamente, ao C3b aderente (DUNKELBERGER, SONG, 2009). A properdina, também conhecida como fator P, estabiliza o complexo C3bBb3b funcionando assim como uma proteína ativadora. O fator H atua na C3 convertase da via alternativa removendo Bb do complexo C3bBb ou servindo como cofator para a proteólise mediada por fator I (RICKLIN et al., 2010).

No hospedeiro vertebrado, após a introdução das formas promastigotas pelo vetor, ocorre a ativação do sistema complemento através das vias, clássica, alternativa ou das

lectinas (MOSSER et al., 1984; 1986; NAVIN et al., 1989; LAURENTI et al., 2004; DOMÍNGUEZ; MORENO, 2003; 2004; AMBROSIO; DE MESSIAS-REASON, 2005).

Limoncu et al. (2011), determinaram pela nefelometria os níveis de C1, C3 e C4 em pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e visceral (LV) e verificam que os níveis de C3 foram maiores que C4 em ambas as formas da doença, confirmando a ativação da via alternativa do complemento. E devido aos níveis elevados de C3, especialmente em pacientes com LC, os autores sugerem que em casos com baixo número de amastigotas ou em regiões onde infecções secundárias, fúngicas e bacterianas são comuns, a determinação do nível de C3 pode ser um parâmetro no diagnóstico da leishmaniose.

O fator B da via alternativa mostra estrutural e funcional homologia com o regulador C2 da via clássica (ZIPFEL, 2001); e o fator H é um importante acelerador do decaimento funcional da via alternativa. Ele pode ligar-se a C3b acoplado a uma célula ou na fase fluida facilitando a degradação enzimática de C3b pelo fator I. Dessa forma, o circuito de amplificação é controlado pelo bloqueio da formação da C3 convertase, dissociação da C3 convertase, ou pela digestão enzimática de C3b (ZIPFEL, 2001; RICKLIN et al., 2010).

As proteínas do sistema Complemento são consideradas proteínas de fase aguda positiva (GABAY, KUSHNER, 1999). Durante processos inflamatórios, há mudanças nas concentrações de diversas proteínas do plasma. Proteína de fase aguda é definida como aquela cuja concentração plasmática aumenta (proteínas de fase aguda positiva) ou diminui (proteínas de fase aguda negativa) por pelo menos 25% durante desordens inflamatórias (GABAY; KUSHNER, 1999).

Noronha et al. (1998) demonstraram que *L. (V.) guyanensis*, entre outras espécies, é capaz de ativar o complemento pela via alternativa. Fato que pode ser aqui reforçado, visto que a expressão diferencial de dois componentes da via alternativa do complemento, Isoforma 1 do fator B nos pacientes em ambos os momentos AT e PT e Isoforma 1 do fator H no grupo

AT, indicando possivelmente a ativação da via alternativa durante a doença, em pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis*.

b) Proteína relacionada à Haptoglobina- A proteína relacionada à haptoglobina (HPR) teve maior expressão em pacientes AT em relação ao grupo controle ($p=0,0364$) [Fig. 01]. A HPR é uma proteína que possui semelhança de 91% com a haptoglobina (Hp) sérica e é encontrada em concentrações baixas, de 5 a 10% do nível da Hp (BENSI et al., 1985; NIELSON et al., 2006). A Hp é uma proteína de fase aguda positiva do soro que se liga a hemoglobina (Hb) livre liberada de células vermelhas do sangue após trauma ou infecção (THEILGAARD-MÖNCH et al., 2006) e por sua vez, se ligam por um complexo de alta especificidade ao receptor CD163 de monócitos e macrófagos, resultando em endocitose mediada por células hepáticas de Kupffer (KRISTIANSEN et al., 2001; GRAVERSEN et al., 2002). Esse processo promove a depuração da Hb/heme livre, evitando danos oxidativos e desencadeia resposta anti-inflamatória (CARTER; WORWOOD, 2007; THOMSEN et al., 2013). Já a HPR, tem alta afinidade pela Hb, mas o complexo formado não é reconhecido pelo receptor CD163, não sendo assim removido da circulação (BENSI et al., 1985; NIELSON et al., 2006; WIDENER et al., 2007). Especula-se que o complexo HPR-Hb liga-se a antioxidante Apolipoproteína AI (ApoA-1) no plasma, protegendo o sistema circulatório das propriedades oxidativas da hemoglobina (GARNER et al., 1998; NIELSON et al., 2006).

A HPR é uma proteína exclusiva de primatas, assim como a Apolipoproteína L-1 (ApoL-1) [SMITH; HAJDUK., 1995; MUJARAN et al., 1998; VANHAMME et al., 2003; POELVOORDE et al., 2004; PEREZ-MORGA et al., 2005; SHIFLETT et al., 2005]. Ambas, juntamente com Apolipoproteína AI (ApoA-1), encontrada em todas as subclasses de HDL, fazem parte do “Trypanosome Lytic Factor” (TLF) [DRAIN et al., 2001; SHIFLETT et al., 2005]. O TLF participa da imunidade inata de primatas protegendo contra a infecção por *Trypanosoma brucei brucei* (THONSON et al., 2009). HPR e ApoL-1 são tóxicas para *T. b.*

brucei, mas quando estão presentes na mesma molécula de HDL, a atividade contra o parasito é aumentada em 800 vezes (SHIFLETT et al., 2005). A ligação da HPR-Hb aumenta significativamente a ligação do TLF ao receptor no *T. b. brucei*, localizado na bolsa flagelar (DRAIN et al., 2001; GREEN et al., 2003). O TLF é então endocitado através de vesículas e levada até o lisossoma. Dentro do ambiente ácido do lisossoma, o TLF é ativado levando o parasito à morte (LORENZ et al., 1994; HAGER et al., 1994; SHIMAMURA et al., 2001). A ApoL-1 possui ação na formação de poros na membrana lisossomal desencadeando influxo de íons e lise do parasito por osmose (PERES-MORGA et al., 2005); e a HPR induz uma reação Fenton dependente de ferro dentro do lisossoma ácido que provoca a formação de radicais livres e peroxidação das membranas lisossomais (HAGER et al., 1994; SMITH et al., 1995; BISHOP et al., 2001).

TLF é considerado como um novo componente da imunidade inata, ele é endocitado por macrófagos e liberado com os lisossomos. Testes *in vitro* demonstram que o TLF pode se ligar à superfície de promastigotas metacíclicas e num pH baixo os faz inchar, provavelmente devido à formação de poros, reduzindo assim a sua infectividade. Nas formas amastigotas, as TLF não se ligam e são resistentes, isto é um exemplo de evasão do patógeno (SAMANOVIC et al., 2009).

Também foi demonstrado que ApoL-1 e HPR foram ambos necessários para a redução de lesões em camundongos transgênicos para TLF *in vivo*. Os dados sugerem que HPR é um ligante para um receptor ainda não identificado em macrófagos, que aumenta a absorção de TLF e ApoL-1, formando então poros diretamente na membrana plasmática de promastigotas metacíclicos prejudiciais ao parasito, mas esse mecanismo de ação não está claramente definido (SAMANOVIC et al., 2009).

Imrie et al (2012), através de ensaio imunoenzimático (ELISA) mediram os níveis de HPR em plasma de crianças do Gabão durante período sazonal de transmissão de malária

onde se detecta resposta de fase aguda na infecção por esta doença e compararam o nível de HPR detectado com o de crianças caucasianas, sem evidência de resposta de fase aguda. O nível de HPR encontrado foi correlacionado com o nível de Hp, sugerindo que suas expressões sejam reguladas pelos mesmos mecanismos, como pela citocina IL-6. Seu nível diminuiu com a idade e foi maior no sexo feminino. Concluíram também que a variação individual nos níveis de HPR está relacionada também ao genótipo Hp, à demografia, à malária e à resposta de fase aguda; e sugerem que o HPR também confere resistência à malária e a outros organismos patogênicos. A HPR também tem sido associada a diversos tipos de câncer, sendo avaliado como antígeno tumoral e indicador de progressão da doença e resposta à terapia (KUHAJDA et al., 1989; EPELBAUM et al., 1998; ZHAO et al., 2007; ABBOTT et al., 2008; HAMRITA et al., 2008).

Apesar da HPR ser considerada proteína de fase aguda positiva de infecção, neste estudo somente foi observada diferença estatística significativa na expressão desta proteína entre o grupo controle e AT ($p=0,0364$). Em relação à diferença entre AT e PT, não houve significância estatística, embora observando-se o gráfico, houve redução da média no grupo PT.

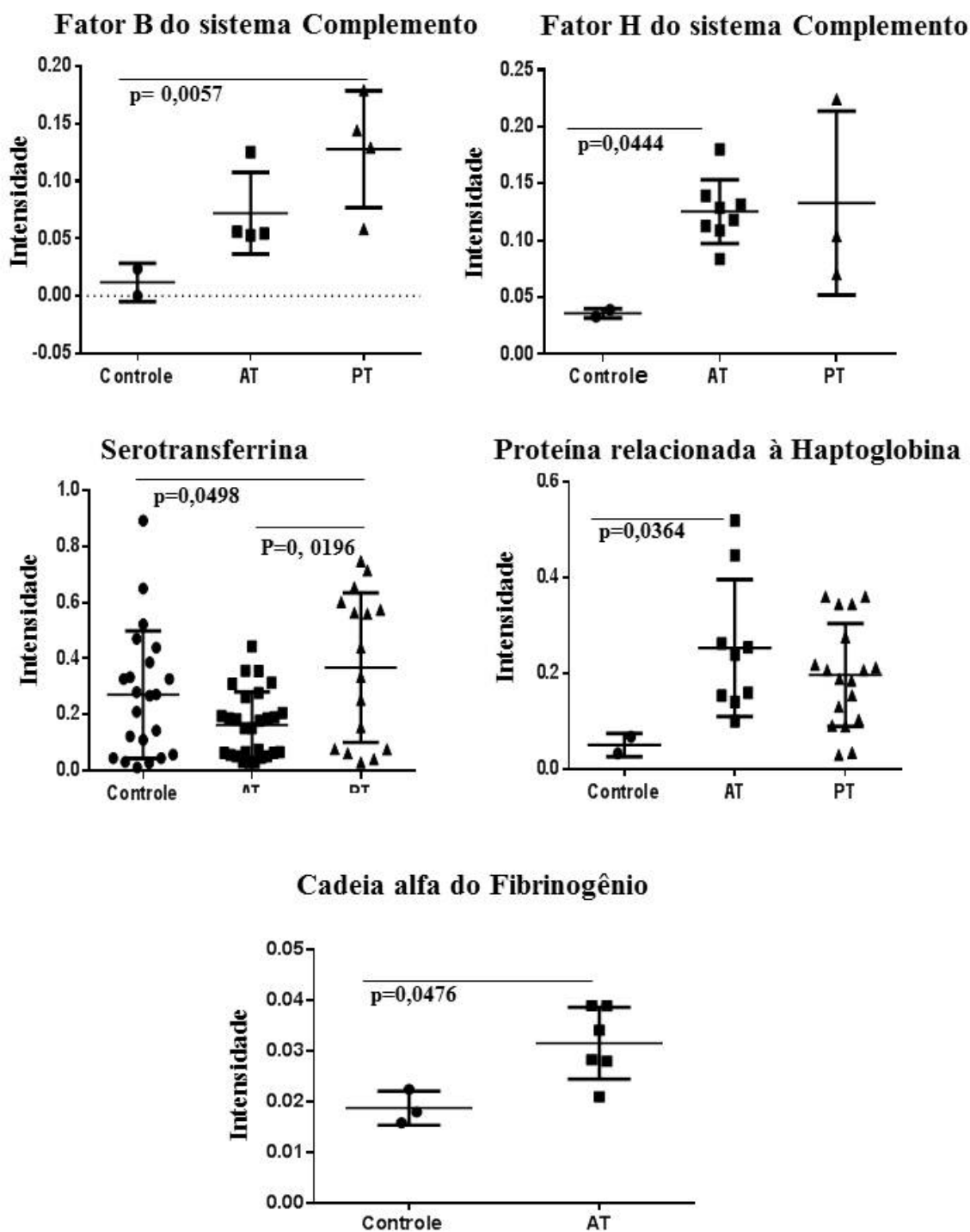


Figura 1. Níveis de intensidade de proteínas diferencialmente expressas em plasma de pacientes com Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* e grupo controle ($p < 0,05$). Legenda: AT: antes tratamento; PT: pós-tratamento com antimonial pentavalente; p: p valor. Os traços indicam as diferenças com relevância estatística das proteínas entre as condições estudadas.

c) *Serotransferrina*- A Serotransferrina é uma proteína de fase aguda negativa (GABAY; KUSHNER, 1999) e, neste estudo, teve menor expressão no AT em relação ao PT ($p=0,0196$) e expressão diferenciada entre o grupo controle e pacientes (AT + PT) [$p= 0,0498$] [Fig. 01]. Esta proteína é classificada como uma transferrina, glicoproteína extracelular transportadora de ferro, encontrada no plasma e no fluido linfático (RATLEDGE; DOVER, 2000). É responsável por doar o ferro para as células através de sua interação com o receptor de transferrina presente na membrana das mesmas. Este complexo é internalizado ocorrendo então a liberação do ferro no *pool* intracelular, que será utilizado no metabolismo da célula ou incorporado a ferritina (BÉRES et al., 2005).

A serotransferrina tem dois centros diferentes de ligação ao ferro e quase nunca está saturada, garantindo a neutralização de qualquer liberação adicional de ferro que possa ocorrer durante infecção, controlando seu nível (RATLEDGE; DOVER, 2000). A toxicidade do ferro está relacionada ao ferro livre, não ligado a transferrina. Quando a concentração de ferro livre aumenta, este pode promover a formação de radicais livres através da reação de Fenton, resultando em estresse oxidativo causando danos teciduais (GOMME; MCCANN, 2005; ANDREWS, 2008; CANÇADO; CHIATONNE, 2010).

Em muitas doenças infecciosas há uma regulação no metabolismo do ferro caracterizado pela hipoferremia, em que há redução dos níveis de saturação da transferrina. Como os microrganismos patogênicos requerem comumente o ferro para o crescimento, proliferação e virulência, a resposta hipoferrêmica acaba reduzindo a disponibilidade do elemento aos patógenos invasores (WEINBERG, 1978; MALAFAIA, 2008; PINTO, 2008).

Estudos utilizando modelo animal sugerem que organismos que passam parte do seu ciclo vital intracelularmente, como o protozoário causador da malária (*Plasmodium*), as micobactérias, *Salmonella* invasiva e *Yersinia*, apresentam crescimento e virulência prejudicados pela deficiência de ferro e são beneficiados pela terapia com este mineral

(OPPENHEIMER, 2001; UMBELINO, 2009). A incidência de malária, por exemplo, é significativamente menor em crianças com deficiência de ferro (OPPENHEIMER, 2001; NYAKERIGA et al., 2004; SAZAWAL et al., 2006).

As leishmanias também necessitam do ferro no ambiente hostil dos macrófagos para seu crescimento intracelular (HUYNH; ANDREWS, 2008; MARQUIS; GROS, 2007). As formas intracelulares possuem enzimas dependentes de ferro que as protegem dos mecanismos microbicidas dos macrófagos, como a metaloenzima superóxido dismutase (SODs), que têm papel na desintoxicação de intermediários reativos de oxigênio, incluindo ânions superóxidos produzidos pelos macrófagos (PARAMCHUK et al., 1997; GHOSH et al., 2003; PLEWES et al., 2003; FANG, 2004; GETACHEW; GEDAMU, 2007). A inativação do Fe-SOD afeta a virulência da *Leishmania* e sobrevivência intracelular (GHOSH et al., 2003).

A hipoferremia durante as doenças infecciosas é desencadeada pelo estímulo da IL-6 na síntese hepática de hepcidina, hormônio regulador do metabolismo do ferro (NEMETH et al., 2004; 2006). Esta inibe a ação da ferroportina, proteína transportadora de ferro celular. Nos macrófagos, o ferro então fica retido ao invés de passar para a transferrina plasmática. A consequência é a hipoferremia que ainda é intensificada pela diminuição da síntese hepática de transferrina e aumento de apoferritina nos macrófagos, favorecendo o armazenamento inacessível do ferro (CANÇADO; CHIATTONE, 2002; FAILACE et al., 2009). Espir (2013), estudando a resposta imune em pacientes com LC causada por *L. (V.) guyanensis* no Amazonas, detectou níveis aumentados da IL-6 nos indivíduos infectados.

Apesar de não ter havido diferença estatística significativa na expressão da serotransferrina entre os grupos Controle e AT, a média de expressão no grupo AT em relação ao controle foi menor. E como houve significância entre AT e PT, com maior expressão protéica no PT, conclui-se que durante a doença, houve uma queda na expressão da Serotransferrina (Fig. 01).

A partir destes resultados, é possível sugerir que a setrotransferrina durante a leishmaniose tem seu nível de expressão diminuído durante a doença provavelmente relacionado a diminuição do ferro livre, fato comum observado em doenças parasitárias; e aumento da sua concentração após a cura clínica, quando o nível de ferro livre volta a aumentar.

d) Cadeia alfa do Fibrinogênio- O Fibrinogênio é uma proteína de fase aguda positiva (KAMATH; LIP, 2003) composta de dois conjuntos idênticos de três cadeias polipeptídicas denominadas $A\alpha$, $B\beta$ e γ , unidas por pontes dissulfeto (STANGOU et al., 2010). No presente trabalho, a expressão da isoforma 1 da cadeia α do fibrinogênio foi maior no grupo AT em relação ao grupo Controle ($p=0,0476$).

Esta proteína do plasma com papel crucial na cascata de coagulação através de sua conversão para fibrina (ARIE et al., 2010) e nas reações inflamatórias tem provável papel no reparo tecidual e na cicatrização. A clivagem por trombina resulta em dois fibrinopeptídeos, e a molécula resultante polimeriza-se e mantém-se estável devido ao fator XIII e a pontes interplaquetárias (ligação do fibrinogênio a glicoproteínas IIb/IIIa) formando a fibrina. Uma vez formada, a fibrina estimula a adesão, a dispersão e a proliferação de células endoteliais (VOLANAKIS, 2005; NETO; CARVALHO, 2009).

Em processos inflamatórios o fibrinogênio interage com leucócitos através das integrinas, receptores de superfície, como Mac-1 e alpha X beta 2. Leucócitos podem induzir receptor para Mac-1 para se ligar ao fibrinogênio. O fibrinogênio possui também ligante para Molécula 1 de Adesão Intercelular (ICAM-1), e aumenta a interação entre células endoteliais e monócitos. A ICAM-1 se comporta como uma superfície de célula ligante de MAC-1, tendo papel fundamental na adesão de leucócitos ao endotélio vascular (ALTILIERE et al., 1988; COLMAN, 1990; ALTIERE et al., 1990). A elevação da concentração do fibrinogênio aumenta a concentração de ICAM-1 na superfície de células endoteliais, resultando na maior

adesão de leucócitos a elas. O fibrinogênio ao se ligar ao receptor na superfície dos leucócitos facilita uma resposta quimiotática, tendo importante papel no processo inflamatório (VAN DE STOLPE, et al., 1996; DUPERRAY, 1997; HARLEY et al., 2000).

Embora não tenha havido detecção da expressão dessa proteína no grupo PT, a evidência da maior expressão nos pacientes antes do tratamento está de acordo com o fato de o fibrinogênio ser considerado uma proteína de fase aguda positiva. As outras cadeias polipeptídicas ($B\beta$ e γ) foram expressas, mas não com diferença estatística significativa entre os grupos.

De modo geral, os resultados deste estudo demonstram que apesar de terem sido observadas diferenças na expressão das proteínas relacionadas à fase aguda de infecção, não foi possível sugerir pelos resultados da análise proteômica de plasma de pacientes coletados até quatro meses pós-tratamento, um marcador de infecção, resolução ou cura clínica, visto que, a menor expressão destas proteínas não foi significativa para este período e em alguns casos houve até um aumento. Vários processos biológicos estão envolvidos na manutenção da expressão das proteínas de infecção mesmo após a cura clínica na leishmaniose cutânea e precisam ser melhor investigados.

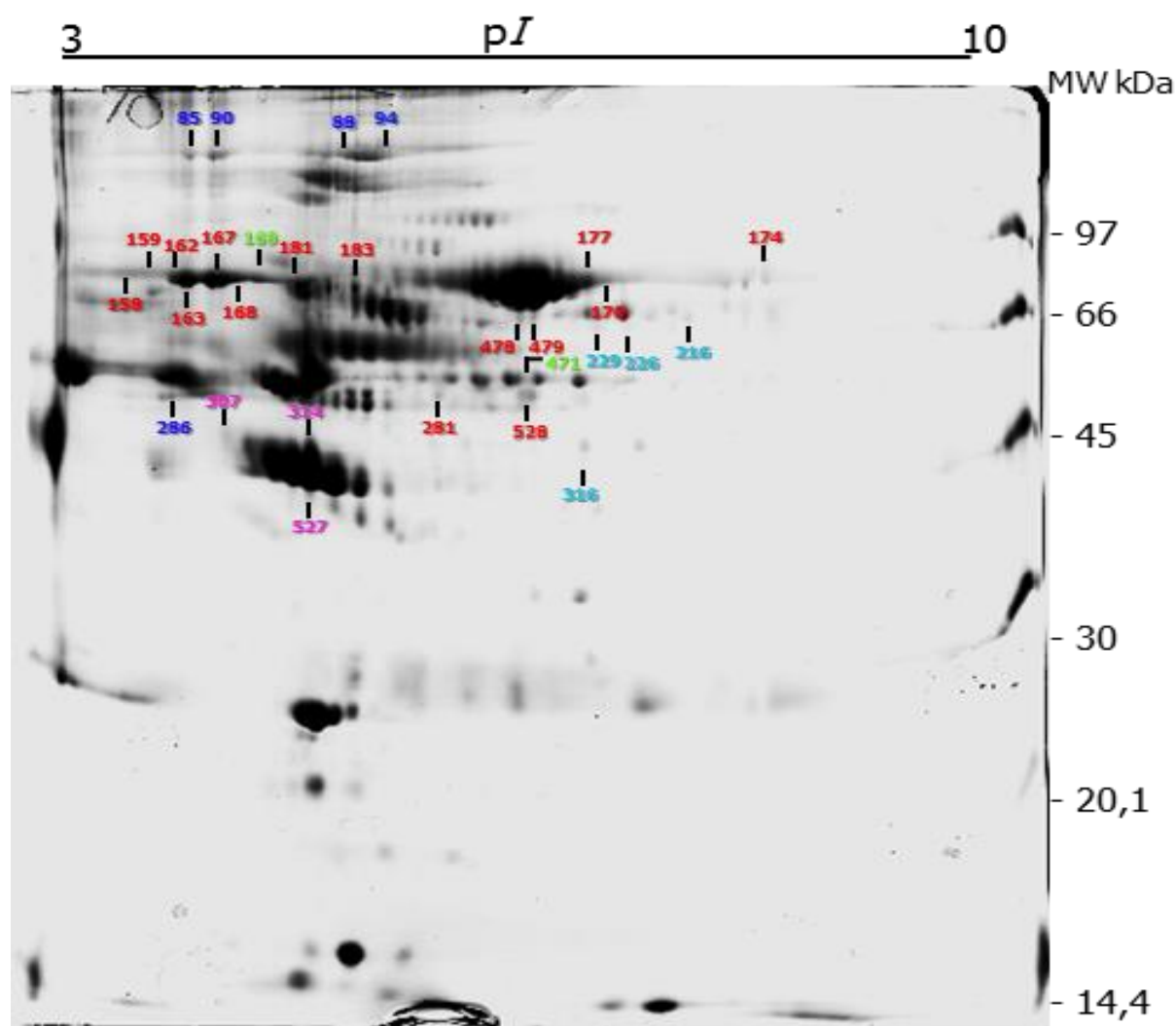


Figura 2. Spots diferencialmente expressos no gel 2-DE de poliacrilamida 12% (13 cm, pH 3-10) do paciente MHOM/BR/11/IM5775 antes do tratamento. Número de spots: 85, 90, 88, 94 e 286 - Isoforma I do fator H do Complemento; 159, 162, 167, 181, 183, 158, 163, 168, 170, 174, 177, 281, 478, 479 e 528 - Serotransferrin; 307, 314 e 527 -HPR; 160 e 471 - Isoforma I do fator B do Complemento; 216, 226, 229, 316 -Isoform 1 da cadeia alfa do Fibrinogênio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, Karen L. et al. Targeted glycoproteomic identification of biomarkers for human breast carcinoma. **Journal of proteome research**, v. 7, n. 4, p. 1470-1480, 2008.

ALTIERI, D. C. *et al.* A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 21, p. 12119-12122, 1990.

ALTIERI, D. C. *et al.* Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. **The Journal of cell biology**, v. 107, n. 5, p. 1893-1900, 1988.

AMBROSIO, A. R.; DE MESSIAS-REASON, I. J. T. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism. **Parasite immunology**, v. 27, n. 9, p. 333-340, 2005.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 1, n. 11, p. 845-67, 2002.

ANDERSON, N. L. *et al.* The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 3, n. 4, p. 311-26, 2004.

ANDREWS, Nancy C. Forging a field: the golden age of iron biology. **blood**, v. 112, n. 2, p. 219-230, 2008.

ASHTON, Peter D.; CURWEN, Rachel S.; WILSON, R. Alan. Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. **Trends in parasitology**, v. 17, n. 4, p. 198-202, 2001.

BANDA, N. K. et al. Complement activation pathways in murine immune complex-induced arthritis and in C3a and C5a generation in vitro. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 159, n. 1, p. 100-108, 2010.

BARBOSA, E. B. *et al.* Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 560–586, 1988.

BENSI, G. et al. Structure and expression of the human haptoglobin locus. **The EMBO journal**, v. 4, n. 1, p. 119, 1985.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, n. 2, p. 47-51, 2007.

BISHOP, Joseph R.; SHIMAMURA, Masako; HAJDUK, Stephen L. Insight into the mechanism of trypanosome lytic factor-1 killing of *Trypanosoma brucei brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 118, n. 1, p. 33-40, 2001.

BORGES, Valéria M.; VANNIER-SANTOS, Marcos A.; DE SOUZA, Wanderley. Subverted transferrin trafficking in Leishmania-infected macrophages. **Parasitology research**, v. 84, n. 10, p. 811-822, 1998.

CANÇADO, Rodolfo D.; CHIATTONE, Carlos S. Anemia de doença crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 4, p. 127-136, 2002.

CANÇADO, Rodolfo Delfini; CHIATTONE, Carlos Sérgio. Visão atual da hemocromatose hereditária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 6, p. 469-75, 2010.

CARTER, Kymberley; WORWOOD, Mark. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. **International journal of laboratory hematology**, v. 29, n. 2, p. 92-110, 2007.

CESTARI, Igor et al. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Molecular immunology**, v. 53, n. 4, p. 328-334, 2013.

CESTARI, Igor; RAMIREZ, Marcel I. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9721, 2010.

CHARMOY, M. *et al.* The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, Article ID 719361, 8 p. 1, 2010.

CHOI, K. M. *et al.* Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. **Diabetes research and clinical practice**, v. 75, n. 2, p. 235-240, 2007.

CHRUSCIAK-TALHARI, Anette *et al.* Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 2, p. 255, 2011.

COLMAN, R. W. Interactions between the contact system, neutrophils and fibrinogen. In: **Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation, and Fibrinolysis**. Springer US, 1990. p. 105-120.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. *et al.* Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 84, p 255–260, 2011.

CUNNINGHAM, M. J. Genomics and proteomics: the new millennium of drug discovery and development. **Journal of Pharmacological and Toxicological**, New York, v. 44, v. 1, p. 291-300, 2000.

CUPOLILLO, E.; GRIMALD, I. G. Jr.; MOMEN, H. A general classification of the New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, n. 3, p. 296-311, 1994.

DAS, Nupur Kanti *et al.* *Leishmania donovani* depletes labile iron pool to exploit iron uptake capacity of macrophage for its intracellular growth. **Cellular microbiology**, v. 11, n. 1, p. 83-94, 2009.

DOMÍNGUEZ, Mercedes *et al.* Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 4, p. 451-459, 2002.

DOMÍNGUEZ, Mercedes et al. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. **Microbes and infection**, v. 5, n. 6, p. 507-513, 2003.

DRAIN, Jerome; BISHOP, Joseph R.; HAJDUK, Stephen L. Haptoglobin-related protein mediates trypanosome lytic factor binding to trypanosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 32, p. 30254-30260, 2001.

DUNKELBERGER, Jason R.; SONG, Wen-Chao. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell research**, v. 20, n. 1, p. 34-50, 2009.

DUPERRAY, A. *et al.* Molecular identification of a novel fibrinogen binding site on the first domain of ICAM-1 regulating leukocyte-endothelium bridging. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 1, p. 435-441, 1997.

ESPIR, T. T. Características da resposta imune em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, antes e após tratamento quimioterápico com antimonial pentavalente. Manaus: UFAM, 2013. 196p.

EPELBAUM, Ron et al. Haptoglobin-related protein as a serum marker in malignant lymphoma. **Pathology & Oncology Research**, v. 4, n. 4, p. 271-276, 1998.

FAILACE, Renato et al. **Hemograma: manual de interpretação**. 3. ed. São Paulo: Grupo A, 2003.

FARIA, D .R. et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 12, p. 7853-7859, 2005.

FANG, Ferric C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 820-832, 2004.

FARRELL, D. H. Pathophysiologic roles of the fibrinogen gamma chain. **Current opinion in hematology**, v. 11, n. 3, p. 151-155, 2004.

FIGUEIRA, L. P. et al. Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, p. 512-514, 2008.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase Proteins. **eLS**, p. 1-6, 2001.

GABAY, Cem; KUSHNER, Irving. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999.

GARNER, Brett et al. Oxidation of high density lipoproteins II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 11, p. 6088-6095, 1998.

GETACHEW, Fitsum; GEDAMU, Lashitew. *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase A is targeted to the mitochondria by its N-terminal positively charged amino acids. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 154, n. 1, p. 62-69, 2007.

GHOSH, Sanjay; GOSWAMI, Srikanta; ADHYA, Samit. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. **Biochem. J**, v. 369, p. 447-452, 2003.

GOMME, Peter T.; MCCANN, Karl B.; BERTOLINI, Joseph. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. **Drug discovery today**, v. 10, n. 4, p. 267-273, 2005.

GOTO, Hiro; SANCHEZ, Maria Carmen Arroyo. Does the Complement System Work for or Against the Host during Parasite Infections. **International Trends in Immunity**, v. 1, n.2, p.11-23, 2013.

GRAVERSEN, Jonas Heilskov; MADSEN, Mette; MOESTRUP, Søren K. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 34, n. 4, p. 309-314, 2002.

GREEN, Heather P. et al. Evidence for a *Trypanosoma brucei* lipoprotein scavenger receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 1, p. 422-427, 2003.

GRIMALDI, G. *et al.* Characterization and classification of leishmanial parasites from human, wild mammals and sand flies in the amazon region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 44, p. 645-661, 1991.

GRUYS, E. *et al.* Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 6, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

GUERRA, J. A. *et al.* American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 85, p. 524-527, 2011.

GUIMARÃES, L. H. *et al.* Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar Clinical Aspects of Tegumentary Leishmaniasis. **GMBahia**, Salvador, v. 75, n. 1, p. 66-74, 2005.

HAGER, Kristin M. et al. Endocytosis of a cytotoxic human high density lipoprotein results in disruption of acidic intracellular vesicles and subsequent killing of African trypanosomes. **nature**, v. 11, n. 13, p. 15-28, 1994.

HAMRITA, Bechr et al. Identification of tumor antigens that elicit a humoral immune response in breast cancer patients' sera by serological proteome analysis (SERPA). **Clinica Chimica Acta**, v. 393, n. 2, p. 95-102, 2008.

HARLEY, S. L.; STURGE, J.; POWELL, J. T. Regulation by fibrinogen and its products of intercellular adhesion molecule-1 expression in human saphenous vein endothelial cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 20, n. 3, p. 652-658, 2000.

HUYNH, Chau; ANDREWS, Norma W. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of Leishmania. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 2, p. 293-300, 2008.

IMRIE, Heather J. et al. Individual Variation in Levels of Haptoglobin-Related Protein in Children from Gabon. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49816, 2012.

KAMATH, S.; LIP, G. Y. H. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. **Qjm**, v. 96, n. 10, p. 711-729, 2003.

KRISTIANSEN, Mette et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 198-201, 2001.

KUHAJDA, Francis P.; KATUMULUWA, Asoka I.; PASTERNAK, Gary R. Expression of haptoglobin-related protein and its potential role as a tumor antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 4, p. 1188-1192, 1989.

LAMBRIS, John D.; RICKLIN, Daniel; GEISBRECHT, Brian V. Complement evasion by human pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 132-142, 2008.

LAURENTI, M. D. et al. The role of complement in the early phase of Leishmania (Leishmania) amazonensis infection in BALB/c mice. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, n. 3, p. 427-434, 2004.

LIMONCU, M. E. et al. Complement C1, C3 and C4 levels in Sera of Leishmaniasis cases in Turkey. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 6, p. 720-724, 2011.

LORENZ, Patrick et al. Importance of acidic intracellular compartments in the lysis of *Trypanosoma brucei brucei* by normal human serum. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 487-488, 1994.

LUGLI, Elena B. et al. Characterization of primate trypanosome lytic factors. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 138, n. 1, p. 9-20, 2004.

MALAFAIA, Guilherme. Captação de ferro pelos parasitos do gênero *Leishmania*. **Revista Biociências**, v. 14, n. 1, 2008.

MARQUIS, Jean-François; GROS, Philippe. Intracellular *Leishmania*: your iron or mine?. **Trends in microbiology**, v. 15, n. 3, p. 93-95, 2007.

MISEK, David E. et al. Early detection and biomarkers in pancreatic cancer. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 5, n. 10, p. 1034-1041, 2007.

MOLINA-PORTELA, Maria Pilar; SAMANOVIC, Marie; RAPER, Jayne. Distinct roles of apolipoprotein components within the trypanosome lytic factor complex revealed in a novel transgenic mouse model. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 8, p. 1721-1728, 2008.

MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1894-1904, 2005.

MOSSER, David M. et al. *Leishmania* species: Mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 62, n. 3, p. 394-404, 1986.

MOSSER, DAVID M.; EDELSON, P. J. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 132, n. 3, p. 1501-1505, 1984.

MURANJAN, Madhavi; NUSSENZWEIG, Victor; TOMLINSON, Stephen. Characterization of the human serum trypanosome toxin, haptoglobin-related protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 7, p. 3884-3887, 1998.

NAIFF, M. F. **Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região**. 80 f. Mestrado em Biologia Celular e Molecular [dissertação]. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1998.

NAIFF, R. D.; TALHAR, I. S.; BARRETT, T. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of nasal mucosa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, p. 529-530, 1988.

NAVIN, T. R.; KRUG, E. C.; PEARSON, R. D. Effect of immunoglobulin M from normal human serum on *Leishmania donovani* promastigote agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. **Infection and immunity**, v. 57, n. 4, p. 1343-1346, 1989.

NEMETH, Elizabeta et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1271-1276, 2004.

NEMETH, Elizabeta et al. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 328-333, 2006.

NETO, N. S. R.; CARVALHO, J. F. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 4, p. 413-430, 2009.

NEVES, L. O. Estudo Clínico Randomizado Comparando Antimoniato e Meglumina, Pentamidina E Anfotericina B Para O Tratamento Da Leishmaniose Cutânea Ocasionada Por *Leishmania guyanensis* Em Centro De Referência De Manaus, Amazonas. 141 f. Mestrado em Medicina Tropical [dissertação] -Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Manaus, 2010.

NIELSEN, Marianne Jensby et al. Haptoglobin-related protein is a high-affinity hemoglobin-binding plasma protein. **Blood**, v. 108, n. 8, p. 2846-2849, 2006.

NIELSEN, Marianne Jensby; MOESTRUP, Søren Kragh. Receptor targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. **Blood**, v. 114, n. 4, p. 764-771, 2009.

NORONHA, Fátima SM et al. Differential sensitivity of New World *Leishmania* spp. promastigotes to complement-mediated lysis: Correlation with the expression of three parasite polypeptides. **Acta tropica**, v. 69, n. 1, p. 17-29, 1998.

NYAKERIGA, Alice M. et al. Iron deficiency and malaria among children living on the coast of Kenya. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 3, p. 439-44, 2004.

NYMAN, T. A. The role of mass spectrometry in proteome studies. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 221-227, 2001.

OKAZAKIA, Toshio; YANAGISAWA, Yuko; NAGAI, Tatsuo. Analysis of the affinity of each haptoglobin polymer for hemoglobin by two-dimensional affinity electrophoresis. **Clinica chimica acta**, v. 258, n. 2, p. 137-144, 1997.

OPPENHEIMER, Stephen J. Iron and its relation to immunity and infectious disease. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 2, p. 616S-635S, 2001.

PAGE, Nigel M. et al. The human apolipoprotein L gene cluster: identification, classification, and sites of distribution. **Genomics**, v. 74, n. 1, p. 71-78, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. P. Review a convite: Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, Amsterdam, v. 26, p. 1709-1724, 2008.

PALMA, M.; MENDES, M.; MARQUES, M.; SOUZA, B; SANTOS, L., SANTOS, K. Fundamentos em análise proteômica, parte I. Laboratório de Biologia Estrutural. Pp. 110. 2007.

PARAMCHUK, Wendy J. et al. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 90, n. 1, p. 203-221, 1997.

PEREZ-MORGA, David et al. Apolipoprotein LI promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 469-472, 2005.

PINTO, Guilherme Malafaia. Deficiência de Ferro: resistência ou suscetibilidade a infecções?. **REVISTA MÉDICA DE MINAS GERAIS-RMMG**, v. 18, n. 3, 2008.

PLEWES, Katherine A.; BARR, Stephen D.; GEDAMU, Lashitew. Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival. **Infection and immunity**, v. 71, n. 10, p. 5910-5920, 2003.

POELVOORDE, Philippe et al. Distribution of apolipoprotein LI and trypanosome lytic activity among primate sera. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 134, n. 1, p. 155-157, 2004.

QUAYE, Isaac K. Haptoglobin, inflammation and disease. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 102, n. 8, p. 735-742, 2008.

RAGHAV, S. K. *et al.* Altered expression and glycosylation of plasma proteins in rheumatoid arthritis. **Glycoconjugate Journal**, v. 23, n. 3-4, p. 167-173, 2006.

RAMIREZ, Marcel I. The Emerging Role of Complement Lectin Pathway in Trypanosomatids: Molecular Bases in Activation, Genetic Deficiencies, Susceptibility to Infection, and Complement System-Based Therapeutics. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

RATH, S. *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: estado da Arte. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RATLEDGE, Colin; DOVER, Lynn G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 881-941, 2000.

RICKLIN, Daniel *et al.* Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature immunology**, v. 11, n. 9, p. 785-797, 2010.

RODRIGUEZ-BONFATE, C. *et al.* Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v.3, p.119-124, 2003.

ROMERO, G. A. S. *et al.* Comparison of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Clinical Findings and Diagnostic Approach. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 32, p. 1304–12, 2001.

SACKS, David; SHER, Alan. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature immunology**, v. 3, n. 11, p. 1041-1047, 2002.

SAMANOVIC, Marie *et al.* Trypanosome lytic factor, an antimicrobial high-density lipoprotein, ameliorates *Leishmania* infection. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 1, p. e1000276, 2009.

SAZAWAL, Sunil *et al.* Effects of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on admission to hospital and mortality in preschool children in a high malaria transmission setting: community-based, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 367, n. 9505, p. 133-143, 2006.

SHIFLETT, April M. *et al.* Human high density lipoproteins are platforms for the assembly of multi-component innate immune complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 38, p. 32578-32585, 2005.

SHIMAMURA, Masako; HAGER, Kristin M.; HAJDUK, Stephen L. The lysosomal targeting and intracellular metabolism of trypanosome lytic factor by *Trypanosoma brucei brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 115, n. 2, p. 227-237, 2001.

SHEVCHENKO, Andrej et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996.

SILVEIRA, F. T. Leishmaniose Cutânea Difusa (Lcd) Na Amazônia, Brasil: Aspectos Clínicos E Epidemiológicos Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (Dcl) In The Amazon Region, Brazil: Clinical And Epidemiological Aspects. **GMBahia**, Salvador, v. 79, n. 3, p. 25-29, 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SMITH, Andrea B. et al. Killing of trypanosomes by the human haptoglobin-related protein. **Science**, v. 268, n. 5208, p. 284-286, 1995.

SMITH, Andrea B.; HAJDUK, Stephen L. Identification of haptoglobin as a natural inhibitor of trypanocidal activity in human serum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 22, p. 10262-10266, 1995.

SCHIRIEFER, A. B.; CARVALHO, E. M. Biomarcadores em Medicina. **GMBahia**, Salvador, v. 78, n. 1, p. 47-51, 2008.

SINAN - **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>. Acesso em 30/09/2012.

STANGOU, A. J. *et al.* Hereditary fibrinogen A α -chain amyloidosis: phenotypic characterization of a systemic disease and the role of liver transplantation. **Blood**, v. 115, n. 15, p. 2998-3007, 2010.

THEILGAARD-MÖNCH, Kim et al. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. **Blood**, v. 108, n. 1, p. 353-361, 2006.

THOMSEN, Jens Haugbølle et al. The Haptoglobin-CD163-Heme Oxygenase-1 Pathway for Hemoglobin Scavenging. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

THOMSON, Russell; SAMANOVIC, Marie; RAPER, Jayne. Activity of trypanosome lytic factor: a novel component of innate immunity. **Future microbiology**, v. 4, n. 7, p. 789-796, 2009.

UMBELINO, D. C.; ROSSI, E. A. Deficiência de ferro: conseqüências biológicas e propostas de prevenção. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 2, p. 103-112, 2009.

VAN DE STOLPE, A. *et al.* Fibrinogen binding to ICAM-1 on EA. hy 926 endothelial cells is dependent on an intact cytoskeleton. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 75, n. 1, p. 182-189, 1996.

VANHAMME, Luc *et al.* Apolipoprotein LI is the trypanosome lytic factor of human serum. **Nature**, v. 422, n. 6927, p. 83-87, 2003.

VANHOLLEBEKE, Benoit *et al.* A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 677-681, 2008.

VANHOLLEBEKE, Benoit *et al.* Distinct roles of haptoglobin-related protein and apolipoprotein LI in trypanolysis by human serum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 10, p. 4118-4123, 2007.

VOLANAKIS, J. E. Acute-phase Proteins in Rheumatic Disease. In: Koopmann WJ, Moreland LW (orgs.). **Arthritis and Allied Conditions**. 15th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

VOYIATZAKI, C. S.; SOTERIADOU, K. P. Identification and isolation of the *Leishmania* transferrin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 13, p. 9112-9117, 1992.

WEINBERG, Eugene D. Iron and infection. **Microbiological Reviews**, v. 42, n. 1, p. 45, 1978.

WIDENER, Justin *et al.* Hemoglobin is a co-factor of human trypanosome lytic factor. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 9, p. e129, 2007.

WILSON, Mary E. *et al.* Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 8, p. 3262-3269, 1994.

WILSON, Mary E. et al. *Leishmania chagasi*: uptake of iron bound to lactoferrin or transferrin requires an iron reductase. **Experimental parasitology**, v. 100, n. 3, p. 196-207, 2002.

ZHAO, Jia et al. Glycoprotein microarrays with multi-lectin detection: unique lectin binding patterns as a tool for classifying normal, chronic pancreatitis and pancreatic cancer sera. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 5, p. 1864-1874, 2007.

ZIPFEL, P.F. Complement: Alternative Pathway. In: **Fullerlove G and Robertson S** (Eds.). Encyclopedia of Life Sciences 5, Nature Publishing Group, London 25-32. 2001.

ANEXO

Nº spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coveage	Macht/nº peptideos (queries)	Sequencia de peptídeos
F85	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	105	9%	15/114	KGEWVALNPLR NGFYPATR HGGLYHENMR RPYFPVAVGK TKNDFTWFK IDVHLPDR SSNLIILEEHLK EFDHNSNIR LSYTCEGGFR LSYTCEGGFR CFEGFGIDGPAIAK CFEGFGIDGPAIAK CFEGFGIDGPAIAK YPSGER EIMENYNIALR
F88	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	96	7%	14/101	GEWVALNPLRK IYKENER HGGLYHENMR HGGLYHENMR RPYFPVAVGK AKYQCK AKYQCK IDVHLPDR SSNLIILEEHLK SSNLIILEEHLK LSYTCEGGFR LSYTCEGGFR YPSGER EIMENYNIALR
F94	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	173	8%	12/124	GEWVALNPLR RPYFPVAVGK SCDIPVFMNAR NDFTWFK NDFTWFK SSNLIILEEHLK SSNLIILEEHLK SSQESYAHGTK SSQESYAHGTK TDCLSLPSFENAIPMGKEK EIMENYNIALR TGESVEFVCK
F90	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	188	7%	11/109	GEWVALNPLR IVSSAMEPDR FVCNSGYK RPYFPVAVGK SCDIPVFMNAR SSNLIILEEHLK SSNLIILEEHLK SSQESYAHGTK CFEGFGIDGPAIAK CFEGFGIDGPAIAK EIMENYNIALR
F479	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	261	17%	13/261	EDPQTFYYAVAVVK DGAGDVAFAVK DGAGDVAFAVK HSTIFENLANK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK
F183	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	388	23%	19/140	EDPQTFYYAVAVVK DGAGDVAFAVK HSTIFENLANK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK DYELLCLDGTR DYELLCLDGTR DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK YLGEEYVK
F162	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	389	34%	33/131	KASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR DGAGDVAFAVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK SKEFQLFSSPHGK EFQLFSSPHGK DLLFKDSAAGFLK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK VPPRMDAK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK EGYGYTGAFR GDVAFAVK HQTVPQNTGGK NLNEKDYELLCLDGTR APNHAVVTR APNHAVVTRK DKEACVHK DKEACVHK LHDRNTYEK AVGNLRK CSTSSLLEACTFR CSTSSLLEACTFR
F478	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	240	18%	15/122	EDPQTFYYAVAVVK HSTIFENLANK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK SHTAVGR SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK
F181	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	295	24%	24/128	EDPQTFYYAVAVVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK ADRDQYELLCLDNTR ADRDQYELLCLDNTR KPVDEYK KPVDEYK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR CDEWSVNSVGK CDEWSVNSVGK SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR EGYGYTGAFR GDVAFAVK HQTVPQNTGGK DKEACVHK DKEACVHK

No spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coverage	Macht/no peptídeos (queries)	Sequencia de peptídeos
F170	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	572	31%	33/123	EDPQTFYYAVAVVK DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK HSTIFENLANKADR HSTIFENLANKADR ADRDQYELLCLDNTR KPVDEYK EFQLFSSPHGK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR LKCDEWSVNSVGK SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK SHTAVGR SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR EGYGYTGAFR GDVAFVK HQTVPQNTGGK DYELLCLDGTR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK YLGEEYVK
F527	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	167	50%	22/123	ILGGHLDK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK VVLHPNYSQVDIGLK VVLHPNYSQVDIGLK VVLHPNYSQVDIGLK VSVNER VMPICLPSK DYAEVGR VGVSWGWR FTDHLK YVMLPVADQDQCIR HYGSTVPEKK HYGSTVPEKK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SCAVAEYGVYVK SCAFAEYGVYVK VTSIQDWVQK
F177	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	662	30%	28/132	KASYLDCIR ASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK HSTIFENLANK EFQLFSSPHGK DLLFKDSAHGFLK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK SASDLTWDNLK SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR GDVAFVK APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK AVGNLRK
F168	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	715	33%	38/166	KASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK KDSGFQMNQLR DSGFQMNQLR DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK HSTIFENLANK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK DSAHGFLK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR EGTCPEAPTDECKPVK KSASDLTWDNLK SASDLTWDNLK SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR EGYGYTGAFR GDVAFVK NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK AVGNLRK AVGNLRK
F163	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	692	32%	38/152	ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK KDSGFQMNQLR DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK SKEQLFSSPHGK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK KSHTAVGR KSHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK NPDPWAK NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK DDTVCLAK DDTVCLAK
F167	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	725	29%	36/144	KASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK EDPQTFYYAVAVVK EDPQTFYYAVAVVK KDSGFQMNQLR DSGFQMNQLR DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK HSTIFENLANK ADRDQYELLCLDNTR ADRDQYELLCLDNTR DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK EGTCPEAPTDECKPVK SASDLTWDNLK SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR DYELLCLDGTR APNHAVVTR APNHAVVTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK

No spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coverage	Macht/no peptideos (queries)	Sequencia de peptídeos
F307	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	291	34%	16/162	ILGGHLDK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK QLVEIEK VSVNER VMPICLPSKDYAEVGR VGYVSGWGR FTDHLK HYEGSTVPEK HYEGSTVPEKK HYEGSTVPEKK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK
F314	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	286	31%	13/147	ILGGHLDK GSPWQAK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK KQLVEIEK QLVEIEK VSVNER VGYVSGWGR FTDHLK HYEGSTVPEK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK
F316	Gene_Symbol=FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	IPI00021885	95656	5.70	43	2%	3/91	EYHTEK EYHTEK HRHPDEAAFFDTASTGK
F226	Gene_Symbol=FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	IPI00021885	95656	5.70	203	8%	10/87	GLIDEVNDFTNR VQHIQLLQK QLEQVIK MKPVPDLVPGNFK MKPVPDLVPGNFK MKPVPDLVPGNFK MELERPGGNEITR GDKELR HPDEAAFFDTASTGK HPDEAAFFDTASTGK
F229	Gene_Symbol=FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	IPI00021885	95656	5.70	55	7%	11/97	DSHSLTTNIMEILR DSHSLTTNIMEILR QLEQVIK MKPVPDLVPGNFK MKPVPDLVPGNFK MKPVPDLVPGNFK MELERPGGNEITR GDKELR GDKELR VTSGSTTTTR VTSGSTTTTR
F216A	Gene_Symbol=FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	IPI00021885	95656	5.70	58	5%	11/129	GLIDEVNDFTNR GLIDEVNDFTNR NSLFYQK NSLFYQK DSHSLTTNIMEILR DSHSLTTNIMEILR RLEVDIDIK GDKELR GDKELR GDKELR GDKELR
F216B	Gene_Symbol=FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	IPI00021885	95656	5.70	93	12%	15/130	NSLFYQK DSHSLTTNIMEILR GDFSSANNR VSEDLR VSEDLR AQLVDMK QLEQVIK MKPVPDLVPGNFK MKPVPDLVPGNFK MKPVPDLVPGNFK VTSGSTTTTR TVIGPDGHK TVIGPDGHK HPDEAAFFDTASTGK QTSSTSYNR
F174	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	223	18%	14/118	EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK DYELLCLDGTR YLGEEYVK
F281	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	158	10%	9/110	ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK
F131	Gene_Symbol=CFB Isoform 1 of Complement factor B (Fragment)	IPI00921523	86847	6.67	70	16%	22/108	LLQEGQALEYVCPSPGFYYPVQTR LLQEGQALEYVCPSPGFYYPVQTR KVGSR LEDVSYHCSR YGLVYATYPK YGLVYATYPK QLNEINYEDHK DLYYIGK DLYYIGK DLYYIGKDR KDNEQHVFK KDNEQHVFK DNEQHVFK ISVIRPSK EAGIPEFYDYDALIK EAGIPEFYDYDALIK EAGIPEFYDYDALIK EAGIPEFYDYDALIK ALFVSEEEK ALFVSEEEKK EKLQDEDLGLF EKLQDEDLGLF
F159	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	387	25%	23/115	ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK EFQFSSPHGK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK SHTAVGR SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK EGYGYTGAFR GDVAFVK NLNEKDYELLCLDGTR APNHAVVTR APNHAVVTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK
F528	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	117	8%	6/110	ASYLDCIR DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK

No spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coverage	Macht/no peptídeos (queries)	Sequencia de peptídeos
F158	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	142	7%	6/171	EDPQTFYYAVAVVK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR KDSSLCK EGYYGYTGAFR HQTVPQNTGGK
F286A	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	94	9%	14/135	IVSSAMEPDR FVCNSGYK NGFYPATR HGGLYHENMR RPYFPVAVGK RPYFPVAVGK TKNDFTWFK IDVHLPDR EQVQSCGPPPELLNGNVK CFEGFGIDGPAIAK CFEGFGIDGPAIAK CFEGFGIDGPAIAK YPSGER EIMENYNIALR
A191	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	506	30%	30/135	EDPQTFYYAVAVVK EDPQTFYYAVAVVK HSTIFENLANK KPVDEYK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK EGYGYTGAFR EGYGYTGAFR EGYGYTGAFR GDVAFVK HQTVPQNTGGK NLNEKDYELLCLDGTR KPVVEYANCHLAR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK YLGEEYVK
A62	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	316	28%	23/122	EDPQTFYYAVAVVK HSTIFENLANK HSTIFENLANKADR KPVDEYK DCHLAQVPSHTVVAR EFQLFSSPHGK DSAHGFLK IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK SHTAVGR SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK EGYGYTGAFR EGYGYTGAFR GDVAFVK HQTVPQNTGGK DYELLCLDGTR DYELLCLDGTR KPVVEYANCHLAR DKEACVHK DKEACVHK
A61	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	229	14%	12/165	EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR HSTIFENLANK HSTIFENLANK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK SHTAVGR SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK KDSSLCK EGYGYTGAFR
E252	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	229	32%	11/145	DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK VVLHPNYSQVDIGLIK VVLHPNYSQVDIGLIK VMPICLPSK VGYVSGWGR YVMLPVADQDQCIR HYGSTVPEK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK VTSIQDWWQK
E249	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	176	41%	14/171	ILGGHLDK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGKK VVLHPNYSQVDIGLIK QKVSVNER VMPICLPSK VGYVSGWGR FTDHLK YVMLPVADQDQCIR HYEGSTVPEKK HYGSTVPEKK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK VTSIQDWWQK
E246	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	343	43%	16/119	ILGGHLDK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGKK DIAPTLTYVGKK DIAPTLTYVGKK VVLHPNYSQVDIGLIK VVLHPNYSQVDIGLIK VMPICLPSK VGYVSGWGR YVMLPVADQDQCIR HYGSTVPEKK HYGSTVPEKK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK VTSIQDWWQK
E241	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	218	29%	15/140	GSPFWQAK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGKK QLVEIEK VVLHPNYSQVDIGLIK VVLHPNYSQVDIGLIK VSVNER VMPICLPSK VGYVSGWGR VGYVSGWGR FTDHLK HYGSTVPEK
E237	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	248	41%	22/118	ILGGHLDK GSPFWQAK GSPFWQAK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGKK DIAPTLTYVGKK DIAPTLTYVGKK KQLVEIEK KQLVEIEK QLVEIEK QLVEIEK VSVNER VMPICLPSK VMPICLPSK VMPICLPSKDYAEVGR VMPICLPSKDYAEVGR VMPICLPSKDYAEVGR VGYVSGWGR FTDHLK HYGSTVPEK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SCAVAEYGVYVK
E235	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	291	34%	19/127	ILGGHLDK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGKK DIAPTLTYVGKK DIAPTLTYVGKK KQLVEIEK KQLVEIEK QLVEIEK QKVSVNER QKVSVNER VSVNER VMPICLPSK VGYVSGWGR FTDHLK YVMLPVADQDQCIR HYGSTVPEKK VTSIQDWWQK VTSIQDWWQK

No spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coveage	Macht/no peptídeos (queries)	Sequencia de peptídeos
E231	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	282	35%	17/134	GSPFWQAK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK QLVEIEK VSVNER VMPICLPSK VGYVSWGWR VGYVSWGWR FTDHLK HYEGSTVPEK HYEGSTVPEKK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK VTSIQDWWQK
E226	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	377	40%	13/132	ILGGHLDK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGKK VMPICLPSK VMPICLPSKDYAEVGR VGYVSWGWR YVMLPVADQDQCIR HYEGSTVPEK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SCAVAEGVYVVK VTSIQDWWQK
E223	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	170	28%	10/167	DIAPTLTLYVGK VSVNER VSVNER FTDHLK YVMLPVADQDQCIR HYEGSTVPEKK HYEGSTVPEKK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK VTSIQDWWQK
E212	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	141	12%	9/146	EDPQTFYYAVAVVK HSTIFENLANK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK EGYGYGTGAFR EGYGYGTGAFR HQTVPQNTGGK KEACVHK
E164	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	142	11%	13/142	DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK HSTIFENLANKADR DSAHGFLK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYGTGAFR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK YLGEEYVK
E138	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	351	19%	17/135	KDSGFQMNQLR CLKDAGDVAFVK DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYGTGAFR HQTVPQNTGGK KPVEEYANCHLAR YLGEEYVK
E133	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	734	31%	43/201	SVIPSDGPSVACVK KASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK EFQLFSSPHGK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR EGTCPEAPTDECKPVK KSASDLTWDNLK KSASDLTWDNLK SASDLTWDNLK KSCHTAVGR KSCHTAVGR SCHATVGR SCHATVGR SCHATVGR SCHATVGR TAGWNIPMGLLYNK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYGTGAFR GDVAFVK GDVAFVK NLNEKYELLCLDGTR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK EACVHK EACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK YLGEEYVK CSTSSLLEACTFR CSTSSLLEACTFR
E132	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	484	33%	37/152	KASYLDCIR ASYLDCIR DSGFQMNQLR DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK ADRDQYELLCLDNTR ADRDQYELLCLDNTR SKEFQLFSSPHGK DLLFKDSAHGFLK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYGTGAFR GDVAFVK GDVAFVK DYELLCLDGTR APNHAVVTR APNHAVVTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK LHDRNTYEK

No spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coverage	Macht/no peptídeos (queries)	Sequencia de peptídeos
E127	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	539	23%	43/181	ASYLDCIR DGAGDVAFAVK DGAGDVAFAVK HSTIFENLANK DQYELLCLDNTR KPVDEYK KPVDEYKDCHLAQVPSHTVVAR KPVDEYKDCHLAQVPSHTVVAR VPPRMDAK VPPRMDAK VPPRMDAK LKCEDESVNSVVGK KSCHTAVGR KSCHTAVGR KSCHTAVGR KSCHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK EACVHK EACVHK KCSTSSLLEACTFR KCSTSSLLEACTFR
E126	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	720	34%	47/186	KASYLDCIR KASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK EDPQTFYYAVAVVK EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR KSCHTGLGR DGAGDVAFAVK HSTIFENLANKADR EFQLFSSPHGK VPPRMDAK VPPRMDAK EGTCPEAPTDECKPVK WCALSHHER WCALSHHER SASDLTWDNLK KSCHTAVGR KSCHTAVGR KSCHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSKK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK GDVAFAVK NLNEKDYELLCLDGTR NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK YLGEEYVK CSTSSLLEACTFR CSTSSLLEACTFR
E125	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	494	22%	44/210	KSCHTGLGR SHTGLGR SHTGLGR CLKDGAGDVAFAVK CLKDGAGDVAFAVK DLLFKDSAHGFLK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK KSCHTAVGR KSCHTAVGR KSCHTAVGR KSCHTAVGR KSCHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR DYELLCLDGTR APNHAVVTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK EACVHK LHRNTYEEK AVGNLRK
E102	Gene_Symbol=CFB Isoform 1 of Complement factor B (Fragment)	IPI00921523	86847	6.67	103	8%	7/106	KVGSQYR LEDSVTYHCSR YGLVTYATYPK VSEADSSNADWVTK KDNEQHVFK DNEQHVFK ALFVSEEEKK
E101	Gene_Symbol=CFB Isoform 1 of Complement factor B (Fragment)	IPI00921523	86847	6.67	196	17%	21/130	LEDSVTYHCSR LEDSVTYHCSR KCLVNLIEK CLVNLIEK YGLVTYATYPK YGLVTYATYPK YGLVTYATYPK VSEADSSNADWVTK QLNEINYEDHK QLNEINYEDHK QLNEINYEDHK DNEQHVFK DNEQHVFK ISVIRPSK EAGIPEFYDYDVALIK YGQTIPICLPCTEGTTR EELLPAQDIK ALFVSEEEK ALFVSEEEK ALFVSEEEKK EKLQDEDLGFL
E99	Gene_Symbol=CFB Isoform 1 of Complement factor B (Fragment)	IPI00921523	86847	6.67	322	20%	21/114	VGSQYR VASYGVKPR YGLVTYATYPK YGLVTYATYPK VSEADSSNADWVTK ISVIRPSK VSVGGEKR EAGIPEFYDYDVALIK YGQTIPICLPCTEGTTR EELLPAQDIK ALFVSEEEK ALFVSEEEK ALFVSEEEKK ALFVSEEEKK ALFVSEEEKK DAQYAPGYDK DISEVVTPR DISEVVTPR GDSGGPLIVHK QVPAHAR EKLQDEDLGFL
E98	Gene_Symbol=CFB Isoform 1 of Complement factor B (Fragment)	IPI00921523	86847	6.67	105	19%	14/120	LLQEQALEYVCPSPGFYPVQTR KVGSQYR KVGSQYR LEDSVTYHCSR YGLVTYATYPK VSEADSSNADWVTK DLYIGK DNEQHVFK KEAGIPEFYDYDVALIK EAGIPEFYDYDVALIK YGQTIPICLPCTEGTTR EELLPAQDIK ALFVSEEEK EKLQDEDLGFL

No spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coverage	Macht/no peptídeos (queries)	Sequencia de peptídeos
E69	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	249	15%	24/121	FVCNSGYK IYKENER CTLKPCDYPDIK HGGLYHENMR RPYFPVAVGK RPYFPVAVGK SCDIPVFMNAR TKNDFTWFK ECELPK IDVHLPDR SSNLIILEHLK SSNLIILEHLK VSVLCQENYLIQEGEEITCK VSVLCQENYLIQEGEEITCKDGR LSYTCEGGFR CFEGFGIDGPAIAK TDCLSLPSFENAIPMGEK TDCLSLPSFENAIPMGEKK TDCLSLPSFENAIPMGEKK QMSKYPSGER YPSGER EIMENYNIALR TGESVEFVCKR TGESVEFVCKR
D94	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	109	13%	9/173	HSTIFENLANK EFQLFSSPHGK DSAHGLK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK DEFFSEGCAPGSK EGYGYGTGAFR DKEACVHK YLGEEYVK
D90	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	208	7%	8/56	HSTIFENLANK HSTIFENLANK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK EGYGYGTGAFR YLGEEYVK
D57	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	219	22%	18/116	DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK EFQLFSSPHGK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK SASDLTWDNLK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYGTGAFR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK YLGEEYVK
D33	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	202	11%	18/128	TGDEITYQCR NGFYFATR NGFYFATR HGGLYHENMR RPYFPVAVGK RPYFPVAVGK RPYFPVAVGK SCDIPVFMNAR TKNDFTWFK IDVHLPDR SSNLIILEHLK SSNLIILEHLK EFDHNSNIR LSYTCEGGFR LSYTCEGGFR CFEGFGIDGPAIAK TDCLSLPSFENAIPMGEK EIMENYNIALR
D32	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	233	15%	23/127	SLGNVIMVCR SLGNVIMVCR GEWVALNPLRK IVSSAMEPDR IVSSAMEPDRYHFGQAVR FVCNSGYK IYKENER RPYFPVAVGK KFYQVK SCDIPVFMNAR TKNDFTWFK NDFTWFK IDVHLPDR SSNLIILEHLK WQSIPLCVEK WQSIPLCVEK SSQESYAHGTK CFEGFGIDGPAIAK CFEGFGIDGPAIAK TDCLSLPSFENAIPMGEK QMSKYPSGER TGESVEFVCK TGESVEFVCK
D127 B	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	475	37%	25/143	ILGGHLDK ILGGHLDK GSFPWQAK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK VVLHPNYSQVDIGLIK VMPICLPSK DYAEVGR VGYVSGWGR HYGESTVPEKK HYEGSTVPEKK HYEGSTVPEKK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK VTSIQDWWQK
D127 A	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	360	35%	18/167	ILGGHLDK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK KQLVEIEK KQLVEIEK VSVNER VSVNER VMPICLPSK VGYVSGWGR YVMLPVADQDCIR HYEGSTVPEKK HYEGSTVPEKK HYEGSTVPEKK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK HYEGSTVPEKK VTSIQDWWQK
D123 B	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	371	40%	22/139	ILGGHLDK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK KQLVEIEK KQLVEIEK VSVNER VSVNER VMPICLPSK DYAEVGR VGYVSGWGR FTDHLK FTDHLK YVMLPVADQDCIR HYEGSTVPEK HYEGSTVPEKK HYEGSTVPEKK SCAVAEYGVYVK VTSIQDWWQK
D123 A	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	180	40%	14/155	ILGGHLDK ILGGHLDK GSFPWQAK DIAPTLTYVGK QLVEIEK VSVNER VMPICLPSKDYAEVGR VGYVSGWGR FTDHLK HYEGSTVPEK HYEGSTVPEK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK VTSIQDWWQK

No spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coverage	Macht/no peptídeos (queries)	Sequencia de peptídeos
D120 B	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	328	21%	13/160	ILGGHLDK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK VGYVSGWGR FTDHLK HYGSTVPEKK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK
D120 A	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	504	41%	24/145	ILGGHLDK GSPFWQAK GSPFWQAK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGKK KQLVEIEK KQLVEIEK QLVEIEK VSVNER VMPICLPSKDYAEVGR VGYVSGWGR FTDHLK HYGSTVPEKK HYGSTVPEKK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK
D119	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	197	22%	11/132	DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK VGYVSGWGR FTDHLK FTDHLK YVMLPVADQDQCIR HYEGSTVPEK VTSIQDWVQK
D118 A	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	370	28%	15/185	DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK QLVEIEK VSVNER VMPICLPSKDYAEVGR VMPICLPSKDYAEVGR VGYVSGWGR FTDHLK HYGSTVPEK SCAVAEYGVYVK SCAVAEYGVYVK
D64	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	760	35%	40/195	KASYLDCIR KASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK SKEFQLFSSPHGK EFQLFSSPHGK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR NPDPAWK NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK EACVHK DLLFRDDTVCLAK LLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK AVGNLRK KCSTSSLEACTFR KCSTSSLEACTFR
D61	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	523	27%	28/189	KASYLDCIR KASYLDCIR ASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK HSTIFENLANK SKEFQLFSSPHGK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR GDVAFVK NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK
D60	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	987	32%	41/176	WCAVSEHEATK WCAVSEHEATK WCAVSEHEATK SVIPSDGPSVACVK SVIPSDGPSVACVK ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK CLKDGAGDVAFVK CLKDGAGDVAFVK KPVDEYK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR LKCDSEWSVNSVGK LKCDSEWSVNSVGK IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK KSASDLTWDNLK KSHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSKK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR NLNEKDYELLCLDGTR NLNEKDYELLCLDGTR NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR DYELLCLDGTR DYELLCLDGTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK EACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK

No spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coverage	Macht/no peptídeos (queries)	Sequencia de peptídeos
D59	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	898	38%	41/189	KASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK KSCHTGLGR SCSHTGLGR DGAGDVAFVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK HSTIFENLANKADR ADRDQYELLCLDNTR ADRDQYELLCLDNTR EFQLFSSPHGK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK VPPRMDAK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR EGTCPEAPTDECKPVK WCALSHHER WCALSHHER LKCDEWSVNSVGK LKCDEWSVNSVGK IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK KSASDLTWDNLK KSCHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK CSTSSLLEACTFR CSTSSLLEACTFR
D55	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	878	38%	46/193	WCAVSEHEATK WCAVSEHEATK WCAVSEHEATK SVIPSDGPSVACVK KASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK SCSHTGLGR DGAGDVAFVK ADRDQYELLCLDNTR EFQLFSSPHGK DSAHGFLK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR IECVSAETTEDCIAK IECVSAETTEDCIAK KSASDLTWDNLK KSASDLTWDNLK SASDLTWDNLK SCSHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR GDVAFVK NLNEKDYELLCLDGTR NLNEKDYELLCLDGTR NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR DYELLCLDGTR DKEACVHK DKEACVHK EACVHK DLLFRDDTVCLAK DDTVCLAK YLGEEYVK YLGEEYVK CSTSSLLEACTFR CSTSSLLEACTFR
D51	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	132	16%	9/32	DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK QLVEIEK QLVEIEK VGYVSGWGR FTDHLK SCAVAEYGVYVK
A133	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	719	37%	39/141	ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK EDPQTFYYAVAVVK DPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR SCSHTGLGR DGAGDVAFVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK HSTIFENLANK KPVDEYK KPVDEYK KEFQLFSSPHGK DSAHGFLK DSAHGFLK LKCDEWSVNSVGK LKCDEWSVNSVGK IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK SASDLTWDNLK KSCHTAVGR KSCHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK FDEFFSEGCAPGSK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR GDVAFVK HQTVPQNTGGK DYELLCLDGTR KPVEEYANCHLAR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK
A129	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	291	21%	25/110	DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK EFQLFSSPHGK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR SCSHTAVGR SCSHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK EGYGYTGAFR GDVAFVK APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK YLGEEYVK AVGNLRK

No spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coverage	Macht/no peptídeos (queries)	Sequencia de peptídeos
A125	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	789	33%	45/206	WCAVSEHEATK WCAVSEHEATK ASYLDCIR KDSGFQMNQLR KSCHTGLGR SCHTGLGR DGAGDVAFAVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK ADRDQYELLCLDNR ADRDQYELLCLDNR VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR IECVSAETTEDCIAK KSASDLTWDNLK SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK KSCHTAVGR KSCHTAVGR KSCHTAVGR SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK LCMGSLNLCENPK GDVAFVK GDVAFVK NLNEKDYELLCLDGTR NLNEKDYELLCLDGTR NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK DDTVCLAK YLGEEYVK CSTSSLLEACTFR
A122 B	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	630	35%	36/129	ASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK KDSGFQMNQLR KDSGFQMNQLR DGAGDVAFAVK HSTIFENLANK KPVDEYK KPVDEYK SKEFQLFSSPHGK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR LKCDEWSVNSVGK SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR EGYGYTGAFR GDVAFVK HQTVPQNTGGK NLNEKDYELLCLDGTR NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR KPVEEYANCHLAR DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK YLGEEYVK
A116	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	320	22%	18/112	108 - 121 815.4103 1628.8059 1628.8086 -0.0027 0 K.EDPQTFYYAVAVVK.K HSTIFENLANK SKEFQLFSSPHGK SKEFQLFSSPHGK DSAHGFLK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK EGYGYTGAFR EGYGYTGAFR GDVAFVK GDVAFVK HQTVPQNTGGK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK YLGEEYVK
A106	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	239	20%	15/138	EDPQTFYYAVAVVK HSTIFENLANK EFQLFSSPHGK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK EGYGYTGAFR EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK DYELLCLDGTR DKEACVHK YLGEEYVK
A97	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	367	24%	22/138	ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR DGAGDVAFAVK HSTIFENLANK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DDTVCLAK YLGEEYVK
A65	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	533	35%	33/118	ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK DGAGDVAFAVK DGAGDVAFAVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK HSTIFENLANK HSTIFENLANK SKEFQLFSSPHGK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR LKCDEWSVNSVGK IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK SASDLTWDNLK SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR GDVAFVK HQTVPQNTGGK DYELLCLDGTR KPVEEYANCHLAR APNHAVVTRK APNHAVVTRK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK

No spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coverage	Macht/no peptídeos (queries)	Sequencia de peptídeos
A64	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	655	35%	43/133	KASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK HSTIFENLANK SKEFQLFSSPHGK DLLFKDSAAGFLK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK FDEFFSEGCAPGSK KSSSLCK KSSSLCK EGYGYTGAFR GDVAFVK NLNEKDYELLCLDGTR NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK AVGNLRK KCSTSSLLEACTFR KCSTSSLLEACTFR
A60	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	344	18%	19/128	DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK DSAHGFLK DSAHGFLK VPPR DSAHGFLK VPPR VPPRMDAK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK KSSSLCK EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK DYELLCLDGTR YLGEEYVK
A204	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	59	12%	4/126	DIAPTLTYLVGK SCAVAEYGVYVK VTSIQDWVQK VTSIQDWVQK
A50	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	11	8%	14/124	FVCNSGYK FVCNSGYK SPDVINGSPISQK SCDNPYIPNGDYSPLR RPYFPVAVGK SCDIPVFMNAR IDVHLVPDR IDVHLVPDR SSNLIILEEHLK SSNLIILEEHLK SSNLIILEEHLK TDCLSLPSFENAIPMGEK TDCLSLPSFENAIPMGEKK EIMENYNIALR
A75	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	72	3%	4/117	HGGLYHENMR RPYFPVAVGK SCDIPVFMNAR EIMENYNIALR
A184	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	133	11%	7/128	MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK EGYGYTGAFR APNHAVVTR YLGEEYVK
A182	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	20	1%	1/123	MYLGYEYVTAIR
A177	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	137	8%	9/121	DSGFQMNQLR DSGFQMNQLR MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK FDEFFSEGCAPGSK EGYGYTGAFR
B396	07 Gene_Symbol=FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	IPI00021885	95656	5.70	62	8%	12/128	NSLFEYQK VSEDLR AQLVDMK DLLPSRDR DRQHLPLIK MKPVPDLVPGNFK MKPVPDLVPGNFK MKPVPDLVPGNFKS QLQK MKPVPDLVPGNFKS QLQK ALTDMPQMR ALTDMPQMR MELERPGNEITR
B379	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	123	12%	8/124	DSGFQMNQLR HSTIFENLANK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK FDEFFSEGCAPGSK EGYGYTGAFR APNHAVVTR YLGEEYVK
B306	Gene_Symbol=FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	IPI00021885	95656	5.70	136	7%	6/119	VTSGSTTTTR HRPDEAAFFDTASTGK GSESGIFTNTK GSESGIFTNTK ESSSHHPGIAEPPSR QFTSSTSYNR
B284	Gene_Symbol=FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	IPI00021885	95656	5.70	119	8%	12/128	GLIDEVNQDFTNR GLIDEVNQDFTNR GDFSSANNR IEVLKR RLEVDIDIK EVDLKDYEDQQK EVDLKDYEDQQK EVDLKDYEDQQK QLEQVIK MKPVPDLVPGNFK MKPVPDLVPGNFK MKPVPDLVPGNFK

No spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coverage	Macht/no peptídeos (queries)	Sequencia de peptídeos
B227	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	78	27%	10/110	DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK QLVEIEK VVLHPNYSQVDIGLIK VSVNER VGYVSWGWR FTDHLK HYEGSTVPEK VTSIQDWVQK
B182	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	189	38%	14/99	DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGKK QLVEIEK VSVNER VGYVSWGWR VGYVSWGWR FTDHLK YVMLPVADQDQIR HYEGSTVPEK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SCAVAEYGVVYK VTSIQDWVQK
B84	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	485	27%	30/139	KDSGFQMNQLR DSGFQMNQLR DGAGDVAFAVK DGAGDVAFAVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK EFQLFSSPHGK DLLFKDSAHGFLK DSAHGFLK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK NPDPAK NPDPAK NLNEKDYELLCLDGTR NLNEKDYELLCLDGTR KPVEEYANCHLAR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK YLGEEYVK CSTSSLLEACTFR
B73	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	131	9%	6/124	DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR EGYGYTGAFR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DLLFRDDTVCLAK
B28	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	709	28%	38/183	ASYLDCIR ASYLDCIR ASYLDCIR SHTGLGR CLKDGAGDVAFAVK CLKDGAGDVAFAVK CLKDGAGDVAFAVK DGAGDVAFAVK DGAGDVAFAVK DGAGDVAFAVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK HSTIFENLANKADR DLLFKDSAHGFLK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR IECVSAETTEDCIAK KSASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK NPDPAK NPDPAK NLNEKDYELLCLDGTR NLNEKDYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK YLGEEYVK CSTSSLLEACTFR CSTSSLLEACTFR
C21	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	167	8%	13/110	EYHFGQAVR FVCNSGYK TGDEITYQCR NGFYPATR NGFYPATR RPYFPVAVGK SCDIPVFMNAR SCDIPVFMNAR IDVHLPDR SSNLIILEEHLK SSNLIILEEHLK AGEQVITYTCATYYK EIMENYNIALR
C20	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	147	10%	15/107	SLGNVIMVCR HGGLYHENMR RPYFPVAVGK SCDIPVFMNAR TKEEYGHSEVVEYYCNP SSNLIILEEHLK EFDHNSNIR LSYTCEGGFR LSYTCEGGFR CFEGFGIDGPAIAK AGEQVITYTCATYYK AGEQVITYTCATYYK YPSGER EIMENYNIALR EIMENYNIALR
C19	Gene_Symbol=CFH Isoform 1 of Complement factor H	IPI00029739	143680	6.21	62	1%	2/149	IVSSAMEPDR WTGRPTCR
C79	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	866	35%	40/181	KASYLDCIR KASYLDCIR ASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK EDPQTFYYAVAVVK KDSGFQMNQLR DGAGDVAFAVK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK SHTAVGR SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK NLNEKDYELLCLDGTR DYELLCLDGTR DYELLCLDGTR KPVEEYANCHLAR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK EACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK

DLLFRDDTVCLAK YLGEEYVK

No spot	Nome da proteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coverage	Macht/no peptídeos (queries)	Sequencia de peptídeos
C74	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.41	644	29%	36/140	KASYLDCIR ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK IMNGEADAMSLDGGFVYIAGK SASDLTWDNLK SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK EGYYGYTGAFR DYELLCLDGTR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK DLLFRDDTVCLAK DDTVCLAK DDTVCLAK AVGNLRK AVGNLRK
C46	Gene_Symbol=CFB Isoform 1 of Complement factor B (Fragment)	IPI00921523	86847	6.67	121	15%	13/116	STGSWSTLK KVGSRQYR VASYGVKPR YGLVTYATYPK DLYYIGK DNEQHVFK EAGIPEFYDYDVALIK EELLPAQDIK ALFVSEEEK DAQYAPGYDK DISEVTPR DISEVTPR GDSGGPLIVHK
C92	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	102	10%	9/121	DGAGDVAFVK HSTIFENLANK DSAHGFLK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK YLGEEYVK
C96	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	814	33%	43/135	EDPQTFYYAVAVVK KDSGFQMNQLR KDSGFQMNQLR KDSGFQMNQLR DSGFQMNQLR DSGFQMNQLR CLKDAGDVAFVK DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK DGAGDVAFVK HSTIFENLANK HSTIFENLANK HSTIFENLANKADR ADRDQYELLCLDNTR ADRDQYELLCLDNTR SKEFQLFSSPHGK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK VPPRMDAK VPPRMDAK MYLGYEYVTAIR IECVSAETTEDCIAK SASDLTWDNLK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSSLCK KDSSLCK KDSSLCK EGYGYTGAFR EGYYGYTGAFR EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK NLNEKYELLCLDGTR KPVVEYANCHLAR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK YLGEEYVK
C191	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	379	48%	21/123	ILGGHLDK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK KQLVEIEK KQLVEIEK QLVEIEK QKVSNER QKVSNER VMPICLPSK VMPICLPSKDYAEVGR DYAEVGR VGYVSGWGR FTDHLK FTDHLK YVMLPVADQDQCIR HYGSTVPEKK HYGSTVPEKK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SCAAEYGVYVK VTSIQDWWQK
C193	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	368	32%	14/144	DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK QLVEIEK VSVNER VMPICLPSK VGYVSGWGR FTDHLK HYGSTVPEK HYGSTVPEKK HYEGSTVPEKK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK VTSIQDWWQK VTSIQDWWQK
C194	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	180	31%	9/132	DIAPTLTYVGK VGYVSGWGR VGYVSGWGR YVMLPVADQDQCIR HYEGSTVPEKK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SCAAEYGVYVK VTSIQDWWQK
C200	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	189	13%	8/130	DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK VSVNER VGYVSGWGR HYGSTVPEKK HYGSTVPEKK
C208	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	365	49%	18/136	ILGGHLDK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK DIAPTLTYVGK QLVEIEK VVLHPNYSQVDIGLIK VSVNER VMPICLPSK VGYVSGWGR FTDHLK FTDHLK YVMLPVADQDQCIR HYGSTVPEK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK

SCAVALYGVYVK VTSIQDWVQK VTSIQDWVQK

No spot	Nome da prtoteína	Código NCBI	kDa	Valor PI	Score Mascot	% Coveage	Macht/no peptídeos (queries)	Sequencia de peptídeos
C216	Gene_Symbol=HPR 31 kDa protein	IPI00431645	31673	8.48	375	41%	14/106	DIAPTLTLYVGK DIAPTLTLYVGKK DIAPTLTLYVGKK VVLHPNYSQVDIGLIK VVLHPNYSQVDIGLIK VSVNER VMPICLPSK VMPICLPSK FTDHLK YVMLPVADQDQCIR HYEGSTVPEK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK SCAVALYGVYVK VTSIQDWVQK
C16	Gene_Symbol=FGA Isoform 1 of Fibrinogen alpha chain	IPI00021885	95656	5.70	90	4%	5/121	MKGLIDEVNQDFTNR GLIDEVNQDFTNR IEVLKR MKPVPDLVPGNFK ALTDMPQMR
C41	Gene_Symbol=CFB Isoform 1 of Complement factor B (Fragment)	IPI00921523	86847	6.67	130	13%	11/125	KVGSQYR KCLVNLIEK CLVNLIEK YGLVTYATYPK DNEQHVF EAGIPEFYDYDVALIK EELLPADIK ALFVSEEEK DAQYAPGYDK VKDISEVVT GDSGGPLIVHK
C45	Gene_Symbol=CFB Isoform 1 of Complement factor B (Fragment)	IPI00921523	86847	6.67	128	9%	8/122	CLVNLIEK YGLVTYATYPK DNEQHVF EAGIPEFYDYDVALIK EELLPADIK ALFVSEEEK ALFVSEEEK GDSGGPLIVHK
C49	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	100	15%	15/107	ASYLDCIR DSGFQMNQLR DGAGDVAFAVK DGAGDVAFAVK KPVDEYK MYLGYEYVTAIR MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK FDEFFSEGCAPGSK FDEFFSEGCAPGSK EGYGYTGAFR GDVAFAVK GDVAFAVK APNHAVVTR YLGEEYVK
C50	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	93	14%	13/100	DSGFQMNQLR HSTIFENLANK SKEQLFSSPHGK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK EGYGYTGAFR EGYGYTGAFR HQTVPQNTGGK APNHAVVTR APNHAVVTR YLGEEYVK YLGEEYVK
C53	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	119	5%	4/122	DGAGDVAFAVK HSTIFENLANK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR
C54	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	112	14%	10/112	EDPQTFYYAVAVVK HSTIFENLANK DQYELLCLDNTR SKEQLFSSPHGK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK GDVAFAVK DYELLCLDGTR DYELLCLDGTR
C63	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	573	33%	35/129	ASYLDCIR EDPQTFYYAVAVVK EDPQTFYYAVAVVK EDPQTFYYAVAVVK DSGFQMNQLR DSGFQMNQLR HSTIFENLANK HSTIFENLANK HSTIFENLANK KPVDEYK DCHLAQVPSHTVVAR DCHLAQVPSHTVVAR SKEQLFSSPHGK SKEQLFSSPHGK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR SASDLTWDNLK SHTAVGR TAGWNIPMGLLYNK TAGWNIPMGLLYNK FDEFFSEGCAPGSK KDSLCK EGYGYTGAFR GDVAFAVK HQTVPQNTGGK DYELLCLDGTR DYELLCLDGTR KPVEEYANCHLAR KPVEEYANCHLAR APNHAVVTR DKEACVHK DKEACVHK DKEACVHK DLLFRDDTVCLAK
C116	Gene_Symbol=TF Serotransferrin	IPI00022463	79294	6.81	114	10%	9/121	HSTIFENLANK EFQLFSSPHGK EFQLFSSPHGK EFQLFSSPHGK DSAHGFLK MYLGYEYVTAIR FDEFFSEGCAPGSK EGYGYTGAFR GDVAFAVK

7. DISCUSSÃO GERAL

As leishmanioses são consideradas um problema de saúde pública mundial, estando entre as dezessete doenças consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO) e ocupa a categoria de doenças emergentes e sem controle (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

O estado do Amazonas é uma região endêmica para a Leishmaniose Tegumentar. Em 2012, apresentou 2235 casos da doença, sendo que os municípios com maior número de casos notificados foram: Manaus (647), Presidente Figueiredo (292) e Rio Preto da Eva (258) [SINAN, 2012].

Durante o desenvolvimento deste estudo, um grande número de pacientes com suspeita de LTA e oriundos de diversas localidades foi atendido pela equipe do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas. A maioria dos pacientes foi atendida através de busca ativa no município de Rio Preto da Eva, região considerada em 2012 como terceira em número de casos da doença. Somados aos pacientes da tese, um grande número de pacientes de projetos anteriores tiveram suas amostras caracterizadas por eletroforese de isoenzimas e que até então ainda não haviam sido publicados.

Dados clínicos e epidemiológicos da população estudada foram discutidos, demonstrando o predomínio da forma cutânea da doença e a predominância de *L. (V.) guyanensis* perante as demais identificadas, *L. (V.) naiffi* e *L. (L.) amazonensis*. Apenas *L. (V.) braziliensis* não foi detectada, mas, segundo Romero et al. (2002), são raros os casos de LC causados por esta espécie nas adjacências de Manaus, Amazonas. Diferente de outras pesquisas onde foram relatados casos por *L. (V.) braziliensis*, incluindo os de forma mucosa da doença em Manaus (COELHO et al., 2010; GUERRA et al., 2011).

A maior parte dos pacientes era do sexo masculino, com predomínio da faixa etária entre 11 e 20 anos e com atividades ligadas à agricultura. A LC é uma importante endemia no município, ocorrendo principalmente ao longo da rodovia AM 010, estando o assentamento Iporá, localizado no KM 127, fato que contribuiu com grande parte da notificação no número de casos. O perfil de transmissão foi preferencialmente silvestre, mas com destaque para a possibilidade de transmissão da doença no intra-peridomicílio.

Foram também identificados isolados de *L. (V.) naiffi* de pacientes com LC, sendo um, o primeiro registro em paciente do estado de Rondônia. Também é sugerido que Estações Experimentais do INPA, localizadas em vicinias da BR174 sejam foco da leishmaniose causada por essa espécie, em virtude da presença de vetores associados à transmissão de *L. (V.) naiffi* nas Estações e outros casos de infecções ocorridas nas mesmas áreas, descritos na literatura (FIGUEIRA et al., 2008).

Análises da expressão de gens em estudos relacionados às doenças endêmicas e negligenciadas têm sido realizadas com o intuito de buscar biomarcadores que possam ser utilizados num fácil e rápido diagnóstico e prognóstico e servir como alvos terapêuticos na infecção de algumas destas doenças.

Através da combinação da técnica de eletroforese 2D com a espectrometria de massas ESI-QToF, foram analisadas proteínas do plasma de pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* antes e após tratamento com antimonial pentavalente (Glucantime®), comparados com plasma de indivíduos sem infecção. Foram identificadas 52 proteínas e 17 isoformas que foram classificadas em grupos funcionais. Cinco destas proteínas tiveram sua expressão diferenciada com base nos valores relacionados à intensidade dos *spots*. Verificou-se que os pacientes infectados apresentavam maior expressão proteica do fator B e fator H da via alternativa do Complemento, da Proteína relacionada à Haptoglobina (HPR) e da Cadeia alfa do Fibrinogênio, e menor expressão da Serotransferrina. Essas proteínas são de fase aguda de

infecção e estão envolvidas no processo inflamatório, sendo necessárias para a homeostasia do organismo.

A resposta inflamatória aguda é uma reação inespecífica do hospedeiro que ocorre após injúria tecidual de causa inflamatória, infecciosa, imune, neoplásica ou traumática. Seu propósito é restabelecer a homeostase e remover a causa do distúrbio presente, antecedendo a resposta imune (GABAY, KUSHNER, 1999; 2001; NETO; CARVALHO, 2009).

No local da invasão por um microorganismo ou lesão do tecido, uma série de respostas é iniciada. Citocinas pró-inflamatórias são liberadas e células inflamatórias são ativadas no sistema vascular. Estas respostas por sua vez estão associadas com produção de uma maior concentração de citocinas e outros mediadores inflamatórios que se difundem para o fluido extracelular e circulam no sangue (GRUYS et al., 2005).

Em alguns casos o processo inflamatório agudo não é completamente resolvido, levando a inflamação crônica, como infecções causadas por microrganismos que conseguem evadir a resposta imune. Esse tipo de inflamação acontece quando macrófagos e células T são constantemente ativados, levando ao seu acúmulo nos sítios de lesão e causando significativo dano tecidual (BILATE, 2010).

Embora as concentrações de vários componentes de fase aguda aumentem em conjunto, nem todos aumentam uniformemente em todos os pacientes com a mesma doença. Estas variações indicam que os componentes da resposta de fase aguda são regulados individualmente, podendo ser explicado, em parte, pelas diferenças nos padrões de produção de citocinas específicas ou seus moduladores em diferentes estados patológicos (GABAY; KUSHNER, 1999).

Os fatores B e H são importantes constituintes da via alternativa do complemento. O fator B mostra estrutural e funcional homologia com o regulador C2 da via clássica (ZIPFEL, 2001) e o fator H é um importante acelerador do decaimento funcional da via alternativa

(ZIPFEL, 2001; RICKLIN et al., 2010). O sistema Complemento apresenta importantes fatores de defesa do organismo contra patógenos (ZIPFEL, 2001). Já foi demonstrado na literatura que pacientes com leishmaniose também ativam a via alternativa do complemento (LIMONCU et al., 2011), inclusive *L. (V.) guyanensis* (NORONHA et al., 1998), fato este também sugerido neste trabalho.

A proteína relacionada à haptoglobina é uma proteína exclusiva de primatas que juntamente com a Apolipoproteína A1, encontrada em todas as classes de HDL, fazem parte do *Trypanosome Lytic Factor* (TLF) [DRAIN et al., 2001; SHIFLETT et al., 2005]. O TLF participa da imunidade inata de primatas protegendo contra a infecção por *Trypanosoma brucei brucei* (THONSOM et al., 2009). TLF é considerado como um novo componente da imunidade inata. Testes *in vitro* já demonstraram que o TLF pode se ligar à superfície de promastigotas metacíclicas, reduzindo assim a sua infectividade. Embora tenha sido demonstrado que TLF não se liga a formas amastigotas (SAMANOVIC et al., 2009), foi demonstrado neste trabalho que o nível de expressão de HPR no grupo AT foi maior que no controle ($p=0,0364$). Não houve diferença estatística significativa entre AT e PT, embora a média do PT tenha sido menor que no AT. Imrie et al (2012), sugerem que o HPR também confere resistência à malária e a outros organismos patogênicos. Devido aos resultados aqui apresentados e informações de literatura quanto a esta proteína, mais estudos sobre a ação dessa proteína e sua interação na infecção com as leishmanias são necessários.

A Serotransferrina é uma proteína classificada como de fase aguda negativa. É uma transferrina, glicoproteína extracelular transportadora de ferro, encontrada no plasma e no fluido linfático (RATLEDGE; DOVER, 2000). É responsável por doar o ferro para as células através de sua interação com o receptor de transferrina presente na membrana das mesmas. Este complexo é internalizado ocorrendo então a liberação do ferro no *pool* intracelular, que será utilizado no metabolismo da célula ou incorporado a ferritina (BÉRES et al., 2005).

Em muitas doenças infecciosas há uma regulação no metabolismo do ferro caracterizado pela hipoferremia, em que há redução dos níveis de saturação da transferrina e diminuição de sua síntese hepática. Como os microrganismos patogênicos requerem comumente o ferro para o crescimento, proliferação e virulência, a resposta hipoferrêmica acaba reduzindo a disponibilidade do elemento aos patógenos invasores (WEINBERG, 1978; MALAFAIA, 2008; PINTO, 2008).

Apesar de não ter havido diferença estatística significativa na expressão da serotransferrina entre o grupo controle e o AT, a média de expressão no grupo AT em relação ao controle foi menor. E como houve significância entre AT e PT, com maior expressão protéica no PT, conclui-se que durante a doença, houve uma queda na expressão da Serotransferrina.

A partir desses resultados é possível sugerir que a serotransferrina na leishmaniose tem seu nível de expressão reduzido, provavelmente quando relacionado a diminuição do ferro livre, fato comum observado em doenças parasitárias, e aumento da sua concentração após a cura clínica, quando o nível de ferro livre volta a aumentar.

O fibrinogênio é uma proteína do plasma com papel crucial na cascata de coagulação através de sua conversão para fibrina (ARIE et al., 2010) e nas reações inflamatórias tem provável papel no reparo tecidual e na cicatrização. A elevação da concentração do fibrinogênio aumenta a concentração de ICAM-1 na superfície de células endoteliais, resultando na maior adesão de leucócitos a elas. O fibrinogênio ao se ligar ao receptor na superfície dos leucócitos facilita uma resposta quimiotática, tendo importante papel no processo inflamatório (VAN DE STOLPE, et al., 1996; DUPERRAY, 1997; HARLEY et al., 2000).

Embora não tenha havido detecção da expressão dessa proteína no grupo PT, a evidência da maior expressão nos pacientes AT está de acordo com o fato de fibrinogênio ser considerado uma proteína de fase aguda positiva.

De modo geral, os resultados deste estudo demonstram que apesar de terem sido observadas diferenças na expressão das proteínas relacionadas à fase aguda de infecção, não foi possível sugerir pelos resultados da análise proteômica de plasma de pacientes coletados até quatro meses pós-tratamento, um marcador de infecção, resolução ou cura clínica, visto que, a menor expressão destas proteínas não foi significativa para este período e em alguns casos houve até um aumento. Vários processos biológicos estão envolvidos na manutenção da expressão das proteínas de infecção mesmo após a cura clínica na leishmaniose cutânea e precisam ser mais bem investigados.

8. CONCLUSÕES GERAIS

✓ As Estações Experimentais do INPA (ZF2 e ZF3) são áreas de foco leishmaniose por *Leishmania (Viannia) naiffi*, devido ao registro de casos da doença em humanos e a captura de vetores desta espécie nessas áreas;

✓ Provavelmente, devido às lesões causadas por *L. (V.) naiffi* não apresentarem uma progressão de tamanho, este seja um parâmetro para a demora na busca de diagnóstico e consequentemente tratamento da doença, o que poderia talvez influenciar no número reduzido de notificações da infecção por esta espécie;

✓ Destaca-se ainda, o registro de *L. (V.) naiffi*, isolada pela primeira vez de um paciente que relatou ter contraído a infecção em Rolim de Moura, Rondônia. Conclui-se então que, além do Amazonas e Pará, *L. (V.) naiffi* também foi isolada de paciente infectado no Estado de Rondônia, fato até então ainda não notificado. Esta espécie já havia sido isolada do tatu *Dasybus novemcinctus* e de *Psychodopygus hirsutus* e *Lutzomyia davisi* neste mesmo Estado por outros autores;

✓ A leishmaniose cutânea é uma endemia de importância no município de Rio Preto da Eva, ocorrendo principalmente ao longo da rodovia AM010, com perfil de transmissão preferencialmente silvestre, mas com destaque também, de acordo com a literatura, para a possibilidade de transmissão da doença no intra-peridomicílio;

✓ Dos 90 pacientes atendidos no Hospital Thomé de Medeiros Raposo e na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão, em Rio Preto da Eva, verificou-se que a doença ocorre em sua maioria entre indivíduos do sexo masculino (70%), com média etária observada de 26 anos entre homens ou mulheres, agricultor ou caseiro (37,7%), infecção primária (76,6%) e a localização de focos endêmicos nas zonas rurais (95,5%). Foi confirmada a circulação das espécies, *L. (V.) guyanensis*/89%, *L. (L.) amazonensis*/ 7,77% e *L. (V.) naiffi* /3,33%, concluindo o importante papel deste município na epidemiologia da Leishmaniose cutânea e a elevada incidência ocasionada por *L. (V.) guyanensis*;

✓ Não foi possível sugerir, pela análise proteômica, um marcador de infecção, resolução ou cura clínica em plasma dos pacientes analisados e infectados por *L. (V.) guyanensis* com até quatro meses pós- tratamento com antimonial pentavalente. Vários processos biológicos estão envolvidos na manutenção da expressão das proteínas de infecção mesmo após a cura clínica na leishmaniose cutânea e precisam ser melhor investigados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, G. M. *et al.* Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro: IV. Frequência mensal em armadilhas luminosas (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 4, p. 465-482, 1985.

AGUIAR, G. M; SOUCASAU, T. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. I-Frequência mensal em isca humana (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae).; Ecological aspects of Phlebotomus of the Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. I-Monthly frequency in human baits (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 2, p. 197-209, 1984.

AHRENS, C. H. *et al.* Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 11, n. 11, p. 789-801, 2010.

AKOPYANTS, N. S. *et al.* Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. **Science**, St. Louis, v. 324, n. 5924, p. 265–268, 2009.

ALBUQUERQUE, L. M. **Análise proteômica comparativa entre plasmas de doadores saudáveis e de pacientes com dengue grave.** Mestrado [dissertação], Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007, f. 72-85.

ALMEIDA, A. F. *et al.* Immunophenotypic characterization of patients with American cutaneous leishmaniasis prior to and after treatment in Pernambuco, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 17, n. 2, p. 230-234, 2011.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. *et al.* On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on preand postcolombian historical source. **História, Ciências e Saúde - Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 852-82, 2003.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n.5, p. 1, 2012.

ALVAREZ, A. M. M. *et al.* Differentiation of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* using BccI for hsp70 PCR-RFLP. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 104, p. 364–367, 2010.

ANDERSON, N. L. *et al.* The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 3, n. 4, p. 311-26, 2004.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 1, n. 11, p. 845-67, 2002.

ANDRADE, M. S. *et al.* Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, n. 3, p. 229-233, 2005.

APPELLA, E. *et al.* Proteome mapping by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis in combination with mass spectrometric protein sequence analysis. **Experientia Supplementum**, Boston, v. 88, p. 1-27, 2000.

AREVALO J. *et al.* Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 195, n. 12, p. 1846-51, 2007.

ARIAS J. R.; DE FREITAS, R. A. Sobre os vetores de leishmaniose cutânea na Amazônia central do Brasil. 2: incidência de flagelados em flebótomos selváticos (.). **Acta Amazônica**, v. 8, n. 3, p. 387-396, 1978.

ARIAS, J. R.; NAIFF, R. D. The reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, central Amazon of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 3, p. 279-286, 1981.

ARMIROTTI, A.; DAMONTE, G. Achievements and perspectives of top-down proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v. 10, n. 20, p. 3566-76, 2010.

ASHTON, P. D.; CURWEN, R. S.; WILSON, R. A. Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.17, n. 4, 2001.

AZPURUA, J. *et al.* Lutzomyias and fly diversity and rates of infection by Wolbachia and an exotic Leishmania species on Barro Colorado Island, Panama. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 3, p. e627, 2010.

BACELLAR, O. *et al.* Interleukin 17 Production among Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 200, p. 75–78, 2009.

BACELLAR, O. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.

BANCHEREAU, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 18, p. 767-811, 2000.

BAÑULS, A. *et al.* Genetic analices of *Leishmania* parasites in Ecuador: are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* distinct taxa? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 61, n. 5, p.838-845, 1999.

BAÑULS, A.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, London, v. 64, p. 1-109, 2007.

BARBOSA, E. B. *et al.* Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Aspectos Imunológicos da Leishmaniose cutânea difusa (Lcd). **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 79, n. 3, p. 35-39, 2009.

BARROSO-FREITAS, A. P. T. *et al.* Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 103, p. 383-389, 2009.

BECKER, I. *et al.* *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll like receptor- 2. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 130, p. 65–74, 2003.

BEKAILD, Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 7, p. 875-888, 2007.

BELKAID, Y. *et al.* CD41CD251 regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, London, v. 420, n. 5, p. 502-507, 2002.

BENSOUSSAN, E. *et al.* Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 145-1439, 2006.

BENTE M. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Proteomics**, Germany, v. 3, p. 1811–29, 2003.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 560–586, 1988.

BERTHO, A. L. *et al.* Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirao Preto, v. 33, p. 317-325, 2000.

BITTAR, R. C. *et al.* T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 625-30, 2007.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do Protozoan Parasites Survive inside Macrophages? **Parasitology Today**, Cambridge, v. 15, n. 1, p. 22-28, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: DF. 2000, 62 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial**. Brasília: DF. 2006. 136 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: DF. 2007. 180 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília: DF. 2010. 443 p.

BRELAZ, M. C. A. *et al.* Brief Definitive Report Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 34, p. 236–239, 2012.

BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. *et al.* Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, New York, v. 279, p. 180–186, 2012.

BRITO, M. E. F. *et al.* Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, p. 203-206, 2001.

BRITO, M. E. F. *et al.* Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 7, n. 2, p. 318-321, 2000.

BROCHU, C. *et al.* Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 10, p. 3073-9, 2003.

CAMPOS, M. B. *et al.* In vitro infectivity of species of *Leishmania (Viannia)* responsible for American cutaneous leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 103, n. 4, p. 771-776, 2008.

CAMPOS, M. B. *et al.* In vitro infectivity of species of *Leishmania (Viannia)* responsible for American cutaneous leishmaniasis. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, p. 771–776, 2008.

CAO, Z.; YENDE, S.; KELLUM, J. A.; ROBINSON, R. A. S. Additions to the Human Plasma Proteome via a Tandem MARS Depletion iTRAQ-Based Workflow. **International Journal of Proteomics**, Cairo, v. 2013, ID 654356, 8 p., 2013.

CARMO, E. V. D. S.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. Neutrophils Reduce the Parasite Burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-Infected Macrophages. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 11, e13815, 2010.

CARRADA, G. *et al.* Monocyte cytokine and costimulatory molecules expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 29, p. 117–126, 2007.

CARVALHO, L. P. *et al.* Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Front in Immunology**, Lausanne, v. 3, p. 301, 2012.

CARVALHO, P. C. *et al.* Marcadores séricos e espectrometria de massa no diagnóstico do câncer. Serum markers and mass spectrometry in the diagnosis of cancer. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro v. 42, n. 6, p. 431-436, 2006.

CASTELLANO, L. R. C. Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. **Academia Biomédica Digital**, Caracas, v. 25, p. 1-10, 2005.

CASTELLANO, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. **Human Immunology**, New York, v. 70, n. 6, p. 383-390, 2009.

CASTRO, E. A. *et al.* Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira valley River, Paraná State, Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 93, p. 141-149, 2005.

CASTRO, M. C. A. B. **Caracterização imunofenotípica em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana**. Mestrado Acadêmico em Saúde Pública [dissertação]. 82 f. Fundação Oswaldo Cruz, Recife. 2011.

CASTRO, M. C.; ACCIOLY, B. DE. **Caracterização imunofenotípica em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana**. 2011. 82 f. Mestrado Acadêmico em Saúde Pública [dissertação] - Fundação Oswaldo Cruz. Recife. 2011.

CHARMOY, M. *et al.* The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, Article ID 719361, 8 p. 1, 2010.

CHOE, L. H.; WERNER, B. G.; LEE, K. H. Two-dimensional protein electrophoresis: from molecular pathway discovery to biomarker discovery in neurological disorders. **The NeuroRx**, v. 3, n. 3, p. 327-335, 2006.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. *et al.* Randomized controlled clinical trial to assess efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania*

(*Viannia*) *guyanensis* in Manaus, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 84, p 255–260, 2011.

COELHO, L. I. A. R. C. Caracterização de *Leishmania spp* em amostras isoladas de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da região Norte, Brasil. Doutorado em Saúde Pública [tese]. 108 f. Fundação Oswaldo Cruz, Recife. 2010.

COELHO, L. I. C. *et al.* Characterization of *Leishmania spp.* causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 671-677, 2011.

COELHO, L. I. C. *et al.* Characterization of *Leishmania spp.* causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas Brazil. **Parasitology Research**, Berlin, v. 108, p. 671-677, 2010.

CONCEIÇÃO-SILVA, F. *et al.* Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 79, p. 221–6, 1990.

COSTA, A. A. U. M. L. *et al.* Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 96, p. 9–15, 2005.

COSTA, J. M. L. *et al.* Modalidades Clínicas, Diagnóstico E Abordagem Terapêutica Da Leishmaniose Tegumentar No Brasil. **GMBahia**, Salvador, v. 79, n. 3, p. 70-83, 2009.

COSTA, J. M. L. Leishmaniose Tegumentar Americana: Origens E Histórico No Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 22, n. 1, p. 71-77, 1992.

COUTINHO, S. G. *et al.* Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 1, p. 139-142, 1998.

COUTINHO, S. G.; PIRMEZ, C.; DA-CRUZ, A. M. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. **Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, n. 1, p. 173-178, 2002.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CUERVO, P. *et al.* *Leishmania (Viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 108, p. 59–66, 2004.

CUERVO, P. *et al.* Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 73, p. 79-92, 2009.

CUERVO, P.; DOMONTB, G. B.; DE JESUS, J. B. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. **Journal Proteomics**, Amsterdam, v. 73, p. 845-867, 2010.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptative Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, New York, v. 72, p. 132-141, Apr. 2002.

CUNNINGHAM, M. J. Genomics and proteomics: the new millennium of drug discovery and development. **Journal of Pharmacological and Toxicological**, New York, v. 44, v. 1, p. 291-300, 2000.

CUPOLILLO, E. *et al.* A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 296-311, 1994.

CUPOLILLO, E. *et al.* A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, p. 142-144, 2000.

CUPOLILLO, E.; GRIMALD, I. G. Jr.; MOMEN, H. A general classification of the New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, n. 3, p. 296-311, 1994.

CUPOLLILO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. Jr. Genetic Diversity: Natural Populations of New World *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.93, n. 5, p.663-668, 1998.

DA-CRUZ, A. M. *et al.* Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. **British Journal of Dermatology**, London, v. 153, n.00, p. 537-543, 2005.

DA-CRUZ, A. M. *et al.* Leishmania-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, p. 2614–18, 1994.

DA-CRUZ, A. M. *et al.* T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: longterm evaluation after therapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, p. 251–6, 2002.

DA-CRUZ, A. M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha in human American tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, p. 225–9, 1996.

DAVIES, C. R. *et al.* Leishmaniasis: a new approach to disease control. **British Medical Journal (Clinical research ed.)**, London, v. 326, p. 377-82, 2003.

DE SENY, D. *et al.* Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 54, n. 6, p. 1066-75, 2008.

DE TREZ, C. *et al.* iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, e1000494, 2009.

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

DELGADO, O. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, p.581-582, 1997.

DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of antileishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol dependent reductase TDR1. **Biochemical Journal**, London, v. 1, n. 2, p. 405-412 , 2004.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, p. 305–318, 2004.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, p. 239-43, 2001.

DIAS-LIMA, A. G.; CASTELLÓN, E. G.; SHERLOCK, I. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma floresta primária de terra firme da Estação Experimental de Silvicultura Tropical, estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 303-316, 2003.

DORVAL, M. E. M. C *et al.* Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.1, p. 43-46, 2006.

DRUMMELSMITH, J. *et al.* Differential protein expression analysis of *Leishmania major* reveals novel roles for methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in methotrexate resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 32, p. 33273–33280, 2004.

DRUMMELSMITH, J. *et al.* Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 2, n. 3, p. 146–155, 2003.

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

ELLIS, M. *et al.* A safety and feasibility study comparing an intermittent high dose with a daily standard dose of liposomal amphotericin B for persistent neutropenic fever. **Journal of Medical Microbiology**, England, v. 58, n. 11, p. 1474-85, 2009.

ESPIR, T. T. Características da resposta imune em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, antes e após tratamento quimioterápico com antimonial pentavalente. Manaus: UFAM, 2013. 196p.

FAGUNDES-SILVA, G. A. *et al.* Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 34, p. 486–491, 2012.

FARIA, D .R. et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 12, p. 7853-7859, 2005.

FARIA, D. R. et al. Recruitment of CD8+ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, p. 432–439, 2009.

FARRAH, T. et al. A high-confidence human plasma proteome reference set with estimated concentrations in PeptideAtlas. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bathesda, v. 10, n. 9, p. M110.006353, 2011.

FARRAH, T. et al. A High-Confidence Human Plasma Proteome Reference Set with Estimated Concentrations in PeptideAtlas. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, Bethesda, v. 10, n. 9, ID M110.006353, 2008.

FIGUEIRA, L. P. *et al.* Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 512-514, 2008.

FIGUEIRA, L. P. et al. Isoenzymatic characterization of human isolates of *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from the municipalities of Rio Preto da Eva and Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, p. 512-514, 2008.

FOUCHER, A. L.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of *Leishmania infantum*. **Journal of Proteomic Research**, Washington, v. 5, p. 1741–50, 2006.

FOUQUE, F. *et al.* Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with changing patterns in the transmission of the human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 35-40, 2007.

FOUQUE, F. *et al.* Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with changing patterns in the transmission of the human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 35-40, 2007.

FRANÇA, E. L. *et al.* Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Juína, Mato Grosso, Brasil. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 19, p. 103-107, Jul/Set. 2009.

FRANCO, A. M. R.; PEREIRA, M. A. S.; FREITAS, R. A. Diversidade da fauna de flebotomíneos em área de assentamento no município de Rio Preto da Eva, estado do Amazonas. In: BERMUDEZ, E. G. C.; TELES, B. R.; ROCHA, R. A. **Entomologia na Amazônia Brasileira**. Editora Inpa. Manaus. 2010, p. 183-206.

FREIRE JOSÉ, F. *et al.* Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 6, p. 537-542, 2001.

GALDOS-RIVEROS, A. C. *et al.* **Proteômica: Novas Fronteiras Na Pesquisa Clínica**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.6, n.11, 2010.

GARCIA, F. C. B. *et al.* Métodos subsidiários para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA): comparação dos resultados do sequenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de leishmânia em amostras cutâneo-mucosas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 340-345, 2005.

GENARO, O. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. Parasitologia Humana, 10ªed., São Paulo: Atheneu, 2000, p. 41-60.

GIL, L. H. S. *et al.* Recent Observations on the Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the Importance of *Psychodopygus davisias* a Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n.6, p.751-755, 2003.

GIL, L. H. S. *et al.* Recent Observations on the Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the Importance of *Psychodopygus davisi* as a Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 751-755, 2003.

GIUDICE, A. *et al.* Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in tegumentary leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 7, p. 1–12, 2007.

GOLLOB, K. J.; ANTONELLI, L. R. V.; DUTRA, W. O. Insights into CD4⁺ memory T cells following *Leishmania* infection. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 8, p. 347-350, 2005.

GOMES A. C.; GALATI E. A. C. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7- Capacidade vetorial flebotômica em ambiente florestal primário do sistema de Serra do Mar, região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Saúde Pública**, v.23, n.2, p. 136-42, 1989.

GOMES-SILVA, A. *et al.* Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical & Experimental Immunology**, London, v. 149, p. 440–444, 2007.

GOMES-SILVA, A. *et al.* Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 135–141, 2008.

GONÇALVES, C. C. *et al.* Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a Western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 66, p. 91, 2002.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmanose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p.71-80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, Londres, v.8, p. 419-433, 2010.

GRIMALDI JR. G. *et al.* Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon Region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, p. 645-661, 1991.

GRIMALDI, G. *et al.* Characterization and classification of leishmanial parasites from human, wild mammals and sand flies in the amazon region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 44, p. 645-661, 1991.

GRIMALDI, G. Jr.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.6, n.3, p.230-250, 1993.

GUEDES, A. C. M.; CARVALHO, M. L. R.; MELO, M, N. Leishmaniose tegumentar Americana: apresentação pouco comum. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 5, p. 445-9, 2008.

GUERRA, J. A. *et al.* American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 85, p. 524–527, 2011.

GUERRA, J. A. *et al.* American tegumentary leishmaniasis in children: epidemiological aspects of cases treated in Manaus, Amazonas, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, cidade v. 23, p. 2215-2223, 2007.

GUERRA, J. A. O. *et al.* Clinical and diagnostic aspects of American Tegumentary Leishmaniosis in soldiers simulatenously exposed to the infection in the Amazon Region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 587–590, 2003.

GUERRA, J. A. O. *et al.* Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 2319-2327, Nov. 2006.

GUERRA, J. A. O. *et al.* Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS neglected tropical diseases**, cidade, v. 5, n. 3, p. e980, 2011.

GUIMARÃES, L. H. *et al.* Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar Clinical Aspects of Tegumentary Leishmaniasis. **GMBahia**, Salvador, v. 75, n. 1, p. 66-74, 2005.

GUIZANI, I. *et al.* Leishmaniasis. **Encyclopedia of Environmental Health**, v. 5, p. 453–480, 2011.

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

HANASH, S. Disease proteomics. **Nature**, London, v. 422, p. 226-232, 2003.

HANDMAN, E.; MCCONVILLE, M. J. WITHDRAWN: The molecular basis of *Leishmania pathogenesis*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, p.1047–1051, 2007.

HAUDEK, V. J. *et al.* Proteome maps of the main human peripheral blood constituents. **Journal of Proteomic Research** , Washington, v. 8, p. 3834-3843, 2009.

HERRERA-NAJERA, C. *et al.* Mining the *Leishmania* genome for novel antigens and vaccine candidates. **Proteomics**, Germany, v. 194, n. 9, p. 301-1293, 2009.

INSENER, M. *et al.* Proteomic analysis of plasma in the polycystic ovary syndrome identifies novel markers involved in iron metabolism, acute-phase response, and inflammation, **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Springfield, v. 95, p. 3863–3870, 2010.

JAMJOOM, M. B. *et al.* *Leishmania donovani* is only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *l. infantum* and “*L. archibaldi*” from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. **Parasitology**, London, v.129, p.399-409, 2004.

JARA, M. *et al.* A real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* in skin and mucosal lesions: an exploratory study of parasite load and clinical parameters **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 51, n. 6, p. 1826-33, 2013.

JEDDI, F.; PIARROUX, R.; CHARLESMARY. Antimony Resistance in *Leishmania*, Focusing on Experimental Research. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2011, ID 695382, 15 pp. 2011.

JUNQUEIRA-PEDRAS, M. *et al.* Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 47, p. 477–485, 2003.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, n. 8, p. 604-15, 2011.

KIM, M. R.; KIM, C. W. Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 849, p. 203–210, 2007.

KIM, S. S. *et al.* Different Isoforms of Apolipoprotein AI Present Heterologous Post-Translational Expression in HIV Infected Patients. **Journal of Proteomic Research** , Washington, v. 6, n. 1, p. 180-184, 2007.

KOCYIGIT, A. *et al.* Antimonial therapy induces circulating proinflammatory cytokines in patients with cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 6589–91, 2002.

KOFF, A. B.; ROSEN, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 31, p. 693-708, 1994.

KOLLS, J. K.; ANDERS LINDÉN, A. Cell Press Interleukin-17 Family Members Review and Inflammation. **Immunity**, Cambridge, v.21, p. 467–476, 2004.

KOSTKA, S. L. *et al.* IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice¹. **Journal of Immunology**, New York, v. 182, p. 3039-3046, 2009.

KÜCKELHAUS, C. S.; KÜCKELHAUS, S. A. S.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I. Influence of long-term treatment with pravastatin on the survival, evolution of cutaneous lesion and weight of animals infected by *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 127, p. 658–64, 2011.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in the New World. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology**. Arnold, London. 2005, p. 313-349.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. **Annales de parasitologie humaine et comparée**, v. 65, n. 5/6, p. 282-284, 1990.

LAINSON, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. **Annales de parasitologie humaine et comparée**, CIDADE, v. 65, n. 5/6, p. 282-284, 1990.

LAINSON, R. *et al.* The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 435-443, 1994.

LAINSON, R. *et al.* The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 435-43, 1994.

LAINSON, R. The Neotropical leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananideua, v. 1, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW J. J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. a parasite of the armadillo, *Dasyus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, Paris, v. 64, p.3-9, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in the New World. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Parasitology. Arnold, York: Oxford University Press; 1998. p. 241-66.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **Evolution, classification and geographical distribution In The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. v. 1. PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (eds), Academic Press, London, 1987, p. 1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* sp. N., a parasite of the armadillo, *Dasyus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Annals Parasitology Human**, v. 64, p. 3-6, 1989.

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

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* Species. In FEG Cox, JP Kreier, DWakelin (eds), **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, Parasitology, v. 9, n. 5, p. 242-266, 1998.

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, G. V.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, New York, v. 213, n. 3-4, p. 183–191, 2008.

LEE, N. *et al.* Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 9, p. 53–64, 2002.

LEE, Y. K. *et al.* Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. **Current Opinion in Immunology**, New York, v. 21, p. 274–280, 2009.

LEFKOVITS, I. Functional and structural proteomics: a critical appraisal a,b. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.787, p. 1–10, 2003.

LEIFSO, K. *et al.* Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigota and amastigote life stage: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 152 p. 35-46, 2007.

LEOPOLDO, P. T. G. *et al.* Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. **BMC Infectious Diseases**, London, v.6, p.75, 2006.

LIMA, E. B. *et al.* Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 2, p. 111-24, 2007.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected Tropical Diseases In Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** São Paulo, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.

LUCAS, C. M. *et al.* *Leishmania (Viannia) lainsoni*: first isolation in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 51, p. 533-537, 1994.

MACIEL, C. M. *et al.* Differential proteomic serum pattern of low molecular weight proteins expressed by adenocarcinoma lung cancer patients. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, London, v. 5, v. 1, p. 31-8, 2005.

MAGDELDIN, S. *et al.* Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis - A Practical Perspective, Gel Electrophoresis - Principles and Basics, **InTech**, Apr. 2012, 346 pp. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/twodimensional-polyacrylamidegel-electrophoresis-a-practical-perspective>> Acesso em: 23 mar. 2013.

MALAFAIA, G.; REZENDE, S. A. O papel dúbio dos neutrófilos na infecção Por parasitos do gênero *Leishmania*: Uma Breve Discussão. **Revista Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 38-44, 2009.

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

MARTINEZ, E. *et al.* A first case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Bolivia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, p. 375-7, 2001.

MARTINS, L.; ALEXANDRINO, A.; GUIMARÃES, G. Detecção de DNA de *Leishmania braziliensis* em pacientes de leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 571-574, 2010.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in BRAZIL-Emerging anropozoonosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.10, n. 2, p.359-375, 1994.

MATTA, N. E. *et al* *Leishmania (Viannia) guyanensis* induces Low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic área of the brazilian amazon highland. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 80, n. 3, p. 339-334, 2009.

MATTA, N. E. *et al*. Immunological responsiveness of cutaneous leishmaniasis patients from endemic area of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Amazonas highland. **Clinical infectious Diseases**, Oxford, 2005.

MATTA, N. E. *et al*. *Leishmania (Viannia) guyanensis* induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon Highland. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 80, n. 3, p. 339-44, 2009.

MCCONVILLE, M. J. *et al*. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **Eur Mol Biol Organ J**, Oxford, v. 11, n. 10, p. 3593-3600, 1992.

MCFARLANE, E. *et al*. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, Washington. v. 76, n. 2, p. 532-541, 2008.

MCNICOLL, F *et al*. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, Germany, v. 6, p. 3567–3581, 2006.

MENDEZ, S. *et al*. Role for CD4CD25 Regulatory T Cells in Reactivation of Persistent Leishmaniasis and Control of Concomitant Immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, Tokyo, v. 200, n. 2, p. 201–210, 2004.

MENDONÇA, M. G. *et al*. Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure? **The Journal of Infectious Diseases** , Chicago, v. 189, p. 1018-1023, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013. Disponível em: <
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_coeficiente_deteccao_lta_entre_990_e_2011.pdf> Acesso em: 30 set. 2012.

MOLL H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 23, p. 1595-1601, 1993.

MORAES, M. A. P.; SILVEIRA, F. T. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 36, p. 459-463, 1994.

MOTA, K. C. **Níveis de isotipos de Imunoglobulinas Específicas para *Leishmania* spp. em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Manaus, Am-Brasil**. 80 f. Mestrado em Patologia Tropical [dissertação] – Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Manaus, 2007.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; PAULA-COELHO, V. N. Meglumine antimonite directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 8, p. 1633–718, 2008.

MURRAY, H. W. Clinical and Experimental Advances in Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 8, p. 2185–2197, 2001.

MURRAY, H. W. *et al.* Advances in leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 366, p. 1561–77, 2005.

NAIFF, M. F. **Leishmaniose Tegumentar na Amazônia. Distribuição geográfica dos agentes etiológicos na região**. 80 f. Mestrado em Biologia Celular e Molecular [dissertação]. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1998.

NAIFF, R. D. *et al.* Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 317–21, 1991.

NAIFF, R. D. *et al.* Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 317–321, 1991.

NAIFF, R. D.; TALHAR, I. S.; BARRETT, T. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of nasal mucosa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, p. 529-530, 1988.

NEELAGIRI, S.; KUMAR, S.; SINGH, S. Tools for Antileishmanial Drug Discovery and Drug Development. **Curret Research & Information on Pharmaceuticals Science**, Nagar, v. 11, n. 2, p. , 2010.

NEVES, L. O. **Estudo Clínico Randomizado Comparando Antimoniato e Meglumina, Pentamidina E Anfotericina B Para O Tratamento Da Leishmaniose Cutânea Ocasionada Por *Leishmania guyanensis* Em Centro De Referência De Manaus, Amazonas**. 141 f. Mestrado em Medicina Tropical [dissertação] -Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. Manaus, 2010.

NGUYEN, S.; FENN, J. B. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 4, p. 1111-7, 2007.

NICOLE, G.L. Culture du parasite Du Bouton d'Orient. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v. 146, p. 842-843, 1908.

NOVAIS, F. O. *et al.* Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against *Leishmania braziliensis* Infection1. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 183, p. 8088-8098, 2009.

NOVY, F.G.E.; MACNEAL, W. J. On the cultivation of *Trypanosome brucei*. **Journal Infectious Diseases**, v. 1, p. 1-30, 1904.

NUGENT, P.G. *et al.* Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 136, p. 51–62, 2004.

NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, Mumbai, v. 2, n. 2, p. 135-146, 2010.

NYMAN, T. A. The role of mass spectrometry in proteome studies. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 221-227, 2001.

O'NEIL, C. E.; LABRADA, M.; SARAVIA, N. G. *Leishmania (Viannia) panamensis* – specific IgE and IgA antibodies relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 49, p. 181-188, 1993.

O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 25, n. 4007-21, May. 1975.

OMENN, G. *Exploring the Human Plasma Proteome*, Wiley-VCH, New York, NY. 2006. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527609482>> Acesso em: 2 jan. 2012.

OMENN, G. S. *et al.* Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 3226-3245, 2005.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, Edinburgh, v. 7, p. 257–266, 2004.

OZBILGE, H.; AKSOY, N.; GUREL, M. S.; YAZAR, S. IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 55, p. 1329–1331, 2006.

PAAPE, D. *et al.* Transgenic, fluorescent *Leishmania mexicana* allow direct analysis of the proteome of intracellular amastigotes. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 7, n. 9, p. 1688–1701, 2008.

PAAPE, D.; AEBISCHERB, T. Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, p. 1614-1624, 2011.

PAES, M. G. *et al.* Sobre a ocorrência de leishmaniose tegumentar em rua de bairro de implantação antiga na Cidade de Manaus (AM). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 31, p. 75, 1998.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. P. Review a convite: Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, Amsterdam, v. 26, p. 1709-1724, 2008.

PALMA, M. et al. **Fundamentos em análise proteômica, parte I**. Laboratório de Biologia Estrutural: São Paulo. 2007. 110 pp.

PETRICOIN, E. F. et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. **Lancet**, London, v. 7, p. 359:572, 2007.

PIMENTEL, M. I. F. et al. Leishmaniose cutânea americana causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis* resistente ao antimoniato de meglumina e com boa resposta terapêutica à pentamidina: relato de um caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 2, p. 254-256, 2011.

PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 91, p.1390-1395, 1993.

PISSINATE, J. F. et al. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-*Leishmania* immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Journal Immunology Methods**, Amsterdam, v. 336, p. 193–202, 2008.

PRATLONG, F. et al. Human cutaneous leishmaniasis caused by *leishmania naiffi* is widespread in south America. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**, p. 781-785, 2002.

PRATLONG, F. et al. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania naiffi* is widespread in South America. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 96, n. 8, p. 781-785, 2002.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 937-54, 2009.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: estado da Arte. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REIS, L. C. et al. Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 23, p. 63-69, 2009.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

RITTING, M. H.; BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 7, p. 292-297, 2000.

ROBERTS, C. G.; WALKER, W.; ALEXANDER, A. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 476-488, 2001.

ROBERTS, W. L.; P. M. RAINEY. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 37, p. 1842-1846, 1993.

ROCHA, R. D. R. *et al.* Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 156-166, 2006.

ROCHA, R. R. D. *et al.* Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa na leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 35, n. 6, p. 551-562, 2002.

RODRIGUES, E. H. G. *et al.* Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.

RODRIGUEZ-BONFATE, C. *et al.* Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v.3, p.119-124, 2003.

ROJAS, E.; SCORZA, J. V.; ESPINOZA, A. Excretion of promastigotes of *Leishmania pifanoi* by experimentally infected *Lutzomyia youngi*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 496-502, 1995.

ROMERO, A. S. R. *et al.* Identificatin of antigenically distinct populations of *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 82, p.25-29, 2002a.

ROMERO, G. A. *et al.* Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 93, p. 49-56, 2005.

ROMERO, G. A. S. *et al.* Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 65, p. 456–465, 2001b.

ROMERO, G. A. S. *et al.* Comparison of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Clinical Findings and Diagnostic Approach. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 32, p. 1304–12, 2001.

ROMERO, G. A. S. *et al.* The rarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis. **Am Trop Med Parasitol**, London, v.96, n.2, p.131-136, Nov. 2002b.

ROOS, B. D. *et al.* Proteomic Methodological Recommendations for Studies Involving Human Plasma, Platelets, and Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Journal of Proteomic Research**, Washington, v. 7, p. 2280–2290, 2008.

ROSENZWEIG, D. *et al.* Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. **Proteomics**, Weinheim, v. 8, n. 9, p. 1843–1850, 2008(a).

ROSENZWEIG, D. *et al.* Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. **The FASEB Journal**, Bathesda, v. 22, n. 2, p. 590–602, 2008(b).

RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 29, n. 12, p. 671-8, 2007.

RUKMANGADACHAR, L. A. *et al.* Two-dimensional difference gel electrophoresis (DIGE) analysis of sera from visceral leishmaniasis patients. **Clinical Proteomics**, Totowa, v. 8, p. 4, 2011.

RYAN, J. R. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 4, p. 1037–1043, 2002.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 69, n. 1, p. 100-03, 1989.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, New York, v. 3, p. 1041-1047, 2002.

SALDANHA, R. R. *et al.* Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and TNF- α production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 106, p. 596-603, 2012.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**, 2 ed. Artes Médicas: São Paulo. 2001.

SANTOS FERREIRA, C. *et al.* Thiol-induced reduction of antimony (V) into antimony (III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. **Biometals**, Oxford, v. 16, p. 441–446, 2003.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. **A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos.** Métodos em Biotecnologia - Proteômica Quantitativa. Boletim de Biotecnologia 7: São Paulo. 2004. 17 pp.

SCHIRIEFER, A. B.; CARVALHO, E. M. Biomarcadores em Medicina. **GMBahia**, Salvador, v. 78, n. 1, p. 47-51, 2008.

SCHUBACH, A. *et al.* Cutaneous scars in American Tegumentary Leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **Journal de Medicine Tropical**, Baltimore, v. 58, v. 6, p. 824-827, Jun. 1998b.

SCHUBACH, A. *et al.* Detection of *Leishmania* by polymerase chain in scars of treated human patients. **Journal Infection Disease**, Oxford, n. 178, v. 3, p. 911-914, Jun. 1998a.

SCHUBACH, A. *et al.* Leishmanial Antigens in the Diagnosis of Active Lesions and Ancient Scars of American Tegumentary Leishmaniasis Patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 7, p. 987-996, 2001.

SCHUBACH, A. O. *et al.* Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, p. 3, p. 213-217, 2005.

SCHWENKENBECHER, J. M. *et al.* Evolution and conservation of microsatellite markers for *Leishmania tropica*. **Infect Genet Evol**, Amsterdam, v.4, p.99-105, Jun. 2004.

SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 12, p. 1707–1713, 2005.

SERENO, D. *et al.* Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, p. 2064–2069, 2001.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 47, p. 412-423, 2009.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in the Amazon Region, natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* in Pará State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 127–30, 1991b.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Dermal leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil, *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* sp.n., a new parasite from the State of Pará. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 289–92, 1987.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Leishmaniose cutânea na Amazônia, isolamento de *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia, Dasyproctidae), no Estado do Pará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, 18–22, 1991a.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, Belém, v. 22, p. 9-20, 2008.

SILVEIRA, F. T. Leishmaniose Cutânea Difusa (Lcd) Na Amazônia, Brasil: Aspectos Clínicos E Epidemiológicos Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (Dcl) In The Amazon Region, Brazil: Clinical And Epidemiological Aspects. **GMBahia**, Salvador, v. 79, n. 3, p. 25-29, 2009.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SILVEIRA, F.T. *et al.* An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, v. 9, n. 1, p. 43-50, 2002.

SILVEIRA, F.T. *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, p. 423-31, 2009.

SILVEIRA, T. G. V. *et al.* Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, CIDADE v. 32, p. 413-423, 1999.

SILVERMAN, J. M. *et al.* Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. **Genome Biol**, London, v. 9, n. 2, p. 35, Feb. 2008.

SIMPSON, L. The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication, and Evolution. **The Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 363-380, 1987.

SINAN - **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>. Acesso em 30/09/2012.

SINAN. **Boletim de Vigilância em Saúde**. Fundação de Vigilância em Saúde. Manaus: AM. 2012. 2 pp.

SOUSA-ATTA, M. L. B. *et al.* Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, p. 101-104, 2002.

SOUZA, A. S. *et al.* Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 10, p. 209, 2010.

SOUZA, M. A. *et al.* American Tegumentary Leishmaniasis: Cytokines and Nitric Oxide in Active Disease and After Clinical Cure, With or Without Chemotherapy. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oxford, v. 76, p. 175–180, 2012.

SOUZA, M. A.; PEREIRA DE, S. M. C. CÔRTE-REAL, S. *Leishmania major*: Parasite Interactions suggesting Sexuality. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 6, p. 761-766, 1997.

STATES, D. J. *et al.* Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, p. 333-338, 2006.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca^{2+} through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, p. 25120–32, 2003.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced Increase in Intracellular Ca^{2+} through Non-selective Cation Channels in the Host and the Parasite Is Responsible for Apoptosis of Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 27, p. 25120–25132, 2003.

TALHARI, S. *et al.* Leishmaniose no Estado do Amazonas-Aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.63, n. 6, p.433-438, 1988.

TELINO, E. *et al.* In vitro responses of human peripheral blood mononuclear cells to whole-cell, particulate and soluble extracts of *Leishmania* promastigotes. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 143, n. 2, p. 338-344, 2006.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2013.

THEILGAARD-MÖNCH, Kim *et al.* Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. **Blood**, v. 108, n. 1, p. 353-361, 2006.

TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F. J. Evolution A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 87, p. 2414-2418, 1990.

TOJAL DA SILVA, A.C. *et al.* Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, v. 11, p. 1388 – 1398, 2006.

TOLEDO, V. P. C. P.; Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 1, p. 89-98, 2001.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmânia: paradox rather than paradigm. **Medical Microbiology and Immunology**, Amsterdam, v. 51, p. 229–242, 2007.

TRUJILLO, C.; RAMIREZ, R.; VÉLEZ, I. D.; BERBERICH, C. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane proteína-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence og IgG subclasses and zapping of epitopes. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 70, p. 203-209, 1999.

URBIG P. Z.; JAHN, H. Use of proteomic methods in the analysis of human body fluids in Alzheimer research. **Electrophoresis**, Germany, v. 33, p. 3617–3630, 2012.

VAISAR, T. *et al.* Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 117, p. 746–756, 2007.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.80, n.4, p.421-428, 2005.

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

VAN DER SNOEK, E. M. *et al.* Spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania naiffi* in two Dutch infantry soldiers. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 34, p. 889-891, 2009.

VAN THIEL, P. P. A. M. *et al.* First Cases of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) naiffi* Infection in Surinam. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 82, p. 588–590, 2010.

VAN THIEL, P.P.A.M. *et al.* First Cases of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) naiffi* Infection in Surinam. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 588–590, 2010.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Hagerstown, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

VERGEL, C. *et al.* Evidence for *Leishmania (Viannia)* parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 194, p. 503–11, 2006.

VERGNES, B. *et al.* proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bathesda, v. 6, p. 1, p. 88-101, 2007.

VIANA, A. G. *et al.* Aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos da leishmaniose tegumentar americana antes e depois de diferentes tratamentos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 1, p. 32-40, 2013.

VICKERS, T. J.; FAIRLAMB, A. H. Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor1B. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 56, p. 279-27246, 2004a.

VICKERS, T. J.; WYLIE, S. H.; FAIRLAMB, A. H. *Leishmania major* elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 9, p. 279:49003, 2004b.

VON STEBUT, E. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. **Experimental Dermatology**, Malden, v. 16, p. 340-346, 2007.

WALKER, J. J. *et al.* Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 147, n. 1, p. 64-73, 2006.

WALTERS, L. L. *et al.* Ultrastructural biology of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* in *Lutzomyia gomezi* (Diptera:Psychodidae) a natural host-parasite association. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 40, p. 19-39, 1989.

WASINGER, V. C. *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 16, n. 7, p. 1090–1094, 1995.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Strategic Direction for Research**. Fev. 2002, p.1-5.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the Leishmaniasis**. Technical Report Series 793. Geneva, 1990. 158 p.

WHO, 2013. Disponível em: < http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/> Acesso em: 11 jun. 2013.

WHO. Technical Report Series 949. Control of the Leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of Leishmaniases. Geneva, Marc. 2010, p. 22-26.

WILKINS, M. R. *et al.* Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, Newcastle, v. 13, p. 19–50, 1996.

WILSON, R. *et al.* Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* Promastigotes to Sand Fly Midguts Assessed Using an Improved Comparative Binding Assay. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 9, p. 816, 2010.

YASUI, Y. *et al.* A data-analytic strategy for protein biomarker discovery: profiling of high-dimensional proteomic data for cancer detection. **Biostatistics**, v. 4, p. 449–463, 2003.

YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia and flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memorian American Entomology Institute**, v. 54, p. 1–88, 1994.

ZALUZEC, E. J.; GAGE, D. A.; WATSON, J. T. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 6, n. 2, p. 109-23, 1995.

ZAMBRANO-VILLA, S. *et al.* How protozoan parasites evade the immune response. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, p. 272-278, 2002.

ZANDBERGEN, G. V. *et al.* Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. **The Journal of Immunology**, New York, v. 173, p. 6521-6525, 2004.

ZANDBERGEN, G. V. *et al.* *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum, **Infection and Immunity**, v. 70, p. 177-4184, 2002.

ZANGGER, H. *et al.* **Detection of *Leishmania* RNA virus in *Leishmania* parasites.** PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e2006, 2013.

ZAPH, C. *et al.* Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* um the absence of persistent parasites. **Nature Medicine**, New York, v. 10, n. 10, 2004.

ZHANG, L. *et al.* Host Proteome Research in HIV Infection. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, Beijing, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2010.

ZILBERSTEIN, D.; DWYERT, D. M. Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. **Biochemical Journal**, London, v. 256, p. 13-21, 1988.

ZULUAGA, M.; ROBLEDO, S. M.; Las células de Langerhans en la inmunidad a leishmaniasis. **Biomédica**, Bogotá, v. 24, p. 302-17, 2004.

ZURBIG, P.; JAHN, H. Use of proteomic methods in the analysis of human body fluids in Alzheimer research. **Electrophoresis**, Germany, v. 33, p. 3617–3630, 2012.

10. ANEXOS

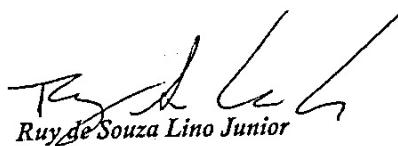


UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
REVISTA DE PATOLOGIA TROPICAL

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que o artigo "Distribuição de casos de Leishmaniose cutânea no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil" de autoria de Luanda P. Figueira, Fabiane V. Soares, Maricleide de F. Naiff, Súsí S. da Silva, Tháís T. Espir, Francimeire G. Pinheiro e Antonia Maria R. Franco, foi apresentado para fins de publicação em 31 de janeiro de 2013, cadastrado com o número 932 e está atualmente sob avaliação dos consultores da área.

Goiânia, 09 de julho de 2013.



Ruy de Souza Lino Junior

Editor da Revista de Patologia Tropical



PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS COM SERES HUMANOS

IDENTIFICAÇÃO DO PROTOCOLO

Protocolo de Pesquisa n°:	193/08	Data de entrada:	28/11/08
Título do Projeto:	Caracterização de proteínas diferencialmente expressas em plasma de pacientes infectados por <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> antes e depois do tratamento e identificação de marcadores proteicos da infecção.		
Áreas do Conhecimento:	4. Ciências da Saúde		
Grupo Temático:	Grupo III		
Data de Início:	01/09	Data de Término:	07/2012
		Valor Orçamento:	R\$ 19.901,90
Pesquisador Responsável:	Luanda de Paula Figueira		
Financiamento:	Não: <input type="checkbox"/>	Sim: <input checked="" type="checkbox"/>	Órgão: <input type="text"/>
Currículos no CNPq:	todos		
Currículos anexos ao Projeto:	nenhum		
Instituição Responsável:	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA		
Resumo do Projeto:	<p>A Região Norte possui a maior taxa de incidência de Leishmaniose do país, sendo a espécie <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> responsável pelo maior número de casos da doença. A análise comparativa de mapas gerados por eletroforese bidimensional de plasmas de indivíduos normais e pacientes infectados com <i>L. (V.) guyanensis</i>, antes e pós-tratamento com antimonial pentavalente, irá possibilitar a identificação de proteínas diferencialmente acumuladas nessas condições. Este projeto se propõe a identificar marcadores proteicos da infecção pela detecção e identificação de proteínas e peptídeos diferencialmente expressos em plasmas de indivíduos não infectados, infectados e tratados para Leishmaniose. Para isso, será utilizada a tecnologia proteômica pela confecção e análise de géis bidimensionais utilizando-se a técnica DIGE ("Differential in-Gel Electrophoresis") e seqüenciamento de proteínas e peptídeos pela espectrometria de massa. A identificação de proteínas relacionadas à infecção através desta metodologia poderá trazer importantes avanços no desenvolvimento de drogas e vacinas mais efetivas para essa doença, endêmica nesta região do Brasil.</p>		

Objetivos (conforme Projeto de Pesquisa)

4. OBJETIVOS, METAS E INDICADORES QUANTITATIVOS PARA CADA META (acrescentar ou excluir linhas conforme necessidade).

OBJETIVOS	METAS	Indicador
-----------	-------	-----------

		Quantitativo
1-Obter mapas proteômicos de plasmas de indivíduos normais de pacientes infectados com <i>Leishmania (V.) guyanensis</i> antes pós-tratamento;	Padronização de mapas proteômicos de plasma humano;	75 mapas 2D
2. Comparar os mapas protéicos obtidos por eletroforese 2D das diferentes fases e averiguar se existem diferenças quantitativas e qualitativas das proteínas expressas nas condições estipuladas;	Análise comparativa dos mapas proteômicos	Analisar em software próprio (platinum v. 7.0) os mapas obtidos
3- Caracterizar através de espectrometria de massa as proteínas diferencialmente expressas nos plasmas de pacientes infectados por <i>Leishmania (V.) guyanensis</i> ;	Seqüenciamento protéico	Seqüenciar em torno de 100 spots alvos para o estudo.
4- Comparar as proteínas/peptídeos específicas das diferentes fases, através da análise pelo método de coloração DIGE e identificar pela espectrometria de massa;	Análise de mapas protéicos utilizando a técnica do DIGE	Analisar as sequências obtidas de em torno de 100 spots selecionados pelo método de DIGE
5- Identificar os possíveis candidatos a marcadores protéicos da infecção por <i>Leishmania (V.) guyanensis</i> ;	Avaliação de seqüências e busca de prováveis marcadores de infecção	Sem indicador quantitativo
6- Detectar os níveis plasmáticos das diferentes imunoglobulinas (IgM, IgG, IgA, IgE) e citocinas (TNF, IL-10, IL-5 e IFN) em pacientes infectados com <i>L. (V.) guyanensis</i> .	Avaliação da resposta humoral	Serão realizados 200 ensaios para detecção de Ig e citocinas em testes de Elisa

PARECER FINAL



Após análise por pareceristas e membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do INPA, informo-lhe que seu protocolo de pesquisa teve a indicação de **APROVAÇÃO**.

Indicação: Aprovar


Comentários:

Após as alterações realizadas conforme sugerido pelo CEP-INPA em parecer anterior, o protocolo está em de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares. Trata-se de Projeto de grande relevância social, bom suporte metodológico e cuidados éticos.

Informo-lhe que deverá apresentar ao CEP-INPA, ao final da pesquisa, cópia da dissertação prevista como produto do projeto, que servirá como relatório de conclusão da pesquisa. Assim, e conforme cronograma apresentado no protocolo, solicita-se que a mesma seja entregue até outubro de 2012.

Data de liberação do Parecer: 17/06/2009 na 47ª Reunião Ordinária do CEP-INPA.

Atenciosamente,


Dra. Júlia Ignês do N. Salem José
Coordenadora do CEP-INPA
PO. Nº 225/2003