

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

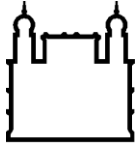
Doutorado em Biologia Parasitária

EFEITO DA DEPLEÇÃO DE FERRO SOBRE *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis*: UMA ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL,
PROTEÔMICA E INTERAÇÃO COM MATRIZES DE
COLÁGENO SINTÉTICAS

CAMILA MESQUITA RODRIGUES

Rio de Janeiro

2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Camila Mesquita Rodrigues

Efeito da depleção de ferro sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis*: uma análise ultraestrutural, proteômica e interação com matrizes de colágeno sintéticas

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. José Batista de Jesus

RIO DE JANEIRO

2016

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

R696 Rodrigues, Camila Mesquita

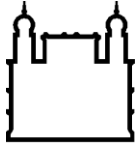
Efeito da depleção de ferro sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis*:
uma análise ultraestrutural, proteômica e interação com matrizes de
colágeno sintéticas / Camila Mesquita Rodrigues. – Rio de Janeiro, 2016.
xix, 210 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 100-116

1. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 2. Depleção de ferro. 3.
Disfunção mitocondrial. 4. Transportadores de ferro. 5. Proteoma. 6.
Matrizes de colágeno sintéticas. I. Título.

CDD 579.42



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Camila Mesquita Rodrigues

**Efeito da depleção de ferro sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis*:
uma análise ultraestrutural, proteômica e interação com matrizes
de colágeno sintéticas**

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Batista de Jesus

Aprovada em: 29/04/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Gabriel Padron Palomares (**Presidente**)

Prof. Dr. Renato Porrozi de Almeida (Membro)

Prof^a. Dra. Maria Cristina Machado Motta (Membro)

Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Suplente)

Prof^a. Dra. Maria Lourenço Dutra (Suplente)

Rio de Janeiro, 29 de abril de 2016

“Todo caminho da gente é resvaloso.
Mas também, cair não prejudica demais
A gente levanta, a gente sobe, a gente volta!
O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:
Esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
Sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.
Ser capaz de ficar alegre e mais alegre no meio da alegria,
E ainda mais alegre no meio da tristeza...”

Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. José Batista de Jesus, pela oportunidade de ingressar na vida acadêmica, pela confiança em meu trabalho e por dividir comigo suas reflexões e pensamento crítico. À Dra. Patricia Cuervo, do Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose, por seus valiosos ensinamentos e também pela amizade e carinho. Agradeço aos dois, Zé e Patty pela atenção, oportunidades e desafios proporcionados durante todo este período de convivência. Seu apoio e incentivo com certeza contribuíram muito para que eu chegasse a esta etapa da minha formação!

Ao Dr. Rubem Menna-Barreto, do Laboratório de Biologia Celular, pela colaboração com o desenvolvimento deste trabalho, pelas facilidades em seu laboratório e pelas discussões referentes aos resultados obtidos. Obrigada pela confiança no meu trabalho, pelo bom humor e pela disposição para lidar com as dificuldades que surgiram. Agradeço igualmente a Ana Bombaça pelo auxílio durante os “experimentos mitocondriais”. Muito obrigada pelas discussões dos resultados, por aquela tabela marota e também pela compreensão e paciência em diversos momentos.

À Dra. Sílvia Amaral, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UERJ, pela colaboração com o presente trabalho. Da mesma forma, agradeço à Michely Mendes pelo auxílio durante a marcação dos parasitos com o TUNEL e o uso do microscópio de fluorescência.

Ao Prof. Dr. Jacek Wisniewski (Department of Proteomics and Signal Transduction, Max-Planck-Institute) pela valiosa colaboração com o presente trabalho e pela gentileza e disponibilidade para responder nossas incontáveis dúvidas.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas pela amizade e pela convivência agradável. Agradeço em especial ao Geovane Lopes pela ajuda no preparo das amostras proteômicas, nas análises dos dados de espectrometria de massas e em toda a burocracia envolvida na defesa da tese. Muito obrigada também à Cinthia Bernardes, Daniele Pita, Natália Lins e Paula Finamore pelo carinho, conversas descontraídas e ajuda sempre que precisei.

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose pela amizade e carinho. Andrés Rodrigues, Monica Losada e Nathalia Souza muito obrigada pela ajuda no preparo das amostras “proteômicas” e nas análises do qPCR. Agradeço também pelos momentos de descontração, discussões científicas e filosóficas. Com certeza vou levar nossa amizade para a vida muito além dos muros da FIOCRUZ.

À Dra Renata Stiebler, do Laboratório de Biologia Celular, por me apresentar ao Laboratório de Bioquímica de Resposta ao Estresse, na UFRJ, onde realizei a quantificação do heme e a dosagem do complexo IV.

À Dra. Márcia Berredo, do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, pelas gentilezas a mim dispensadas e pelas facilidades em seu laboratório. Obrigada também por sanar as minhas dúvidas durante o uso do programa PDQuest.

À Cássia Castro, Eliane Margotti e Jonatan Marques, do Departamento de Medicina da UFSJ, pelo carinho a mim dispensado. Agradeço em especial ao Jonatan que intermediou a análise de espectrometria de massas das proteínas da secreção junto ao Laboratório de Enzimologia e Proteômica da UFOP.

À Camila Faria pelo apoio técnico durante a obtenção e o preparo do colágeno.

Às amigas Bianca Vitória, Ellen Altoé, Keyla Santos, Lívia Santos e Lívia Uehara pelos momentos de descontração, pelas longas conversas na sala de cultura e por serem um ombro amigo sempre que precisei. Xus, vocês moram no meu coração! Muito obrigada por tudo!

A André Veloso, Clara Carolina, Marcelle Caminha, Renan Pazini, Thabata Duque e Vitor Vidal pela amizade e carinho.

Às Plataformas de Citometria de Fluxo, Microscopia Eletrônica e Eletroforese Bidimensional do Instituto Oswaldo Cruz, tão necessárias para a conclusão deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro deste trabalho através da bolsa de doutorado.

A todos os meus professores por seus valiosos ensinamentos que despertaram em mim a paixão pela leitura, pelo estudo, pela biologia e mais especificamente pela parasitologia. Sem vocês certamente não teria chegado até aqui!

Á minha mãe Cleusa e ao meu pai Romero agradeço pelo apoio incondicional todos os dias, pela força nos momentos difíceis e por todo amor e paciência dedicados a mim. Sem sua força e confiança inabalável nada teria acontecido. Amo vocês!

Ao meu namorado Marcus Baldanza pela presença, força, positividade, carinho e amor. Obrigada por me fazer confiar mais em mim e nessa aventura que é a vida. Que esse seja nosso primeiro de muitos desafios juntos.

Á Deus pelas inúmeras vezes em que me fez ter coragem e me encher de confiança para encarar os desafios. Muito obrigada por abrir as janelas quando todas as portas estavam fechadas!

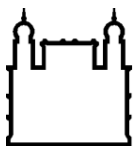
ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Leishmaniose</i>	1
1.2. <i>O ciclo evolutivo de Leishmania spp</i>	3
1.3. <i>Morfologia e ultraestrutura dos protozoários do gênero Leishmania</i>	6
1.4. <i>O papel da mitocôndria no metabolismo energético de Leishmania e outros tripanossomatídeos</i>	11
1.5. <i>Geração de ROS e metabolismo oxidativo na mitocôndria de Leishmania</i>	14
1.6. <i>Aquisição e transporte de ferro pelos mamíferos</i>	16
1.7. <i>Importância do ferro durante os processos infecciosos por protozoários</i>	20
1.8. <i>Aquisição, transporte e importância do ferro para a infecção por Leishmania</i>	22
1.9. <i>Matriz extracelular (MEC) e sua importância durante a infecção por Leishmania</i>	28
1.10. <i>Peptidases de Leishmania</i>	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. <i>Objetivo geral</i>	31
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. <i>Parasitas</i>	32
3.2. <i>Quelante de ferro</i>	32
3.3. <i>Curva de crescimento</i>	33
3.4. <i>Ensaio de citotoxicidade</i>	33
3.5. <i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	34
3.6. <i>Análise do potencial de membrana mitocondrial e da integridade da membrana celular por citometria de fluxo utilizando os marcadores TMRE e PI</i>	34
3.7. <i>Análise de fragmentação do DNA nuclear por microscopia de fluorescência utilizando o marcador TUNEL</i>	35
3.8. <i>Eletroforese bidimensional e espectrometria de massas de L. (V.) braziliensis cultivada na ausência e na presença de 100 µM de DIP</i>	36
3.8.1. <i>Extração de proteínas</i>	36

3.8.2. Eletroforese bidimensional	37
3.8.3. Visualização das proteínas e análise da imagem dos géis bidimensionais	37
3.8.4. Digestão de proteínas, extração de peptídeos e espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF).....	37
3.9. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR)	38
3.10. Quantificação do ferro intracelular e extracelular pelo método da ferrozina .	42
3.11. Quantificação da concentração intracelular e extracelular do heme pelo método da piridina alcalina.....	43
3.12. Determinação do consumo de oxigênio	43
3.13. Determinação da atividade do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons	44
3.14. Determinação da expressão proteica de <i>L. (V.) braziliensis</i> cultivada na ausência e na presença de 100 µM de DIP através do método MED-FASP (Multi-Enzyme Digestion – Filter Aided Sample Preparation) e espectrometria de massas.....	44
3.8.1. O método MED-FASP	44
3.8.2. Espectrometria de massas	45
3.8.3. Identificação das proteínas	46
3.15. Ensaio com matrizes de colágeno 3D	46
3.15.1. Obtenção da solução de colágeno tipo I	46
3.15.2. Preparação da matriz de colágeno 3D e ensaio de invasão de <i>L. (V.) braziliensis</i> sobre a matriz polimerizada	47
3.15.3. Microscopia eletrônica de varredura	47
3.15.4. Separação e digestão das proteínas secretadas durante o ensaio de invasão de <i>L. (V.) braziliensis</i> sobre a matriz polimerizada	47
3.15.5. Separação e digestão das peptidases secretadas durante o ensaio de invasão de <i>L. (V.) braziliensis</i> sobre a matriz polimerizada	48
3.15.6. Espectrometria de massas.....	49
4. RESULTADOS	50
4.1. Efeito do quelante de ferro DIP sobre o crescimento celular e a ultraestrutura mitocondrial de <i>L. (V.) braziliensis</i>	50
4.1.1. Efeito da depleção de ferro sobre a curva de crescimento dos isolados de <i>L. (V.) braziliensis in vitro</i>	50
4.1.2. Avaliação da citotoxicidade do DIP sobre as formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	51
4.1.3. Reversibilidade do efeito do quelante DIP sobre a proliferação de <i>L. (V.) braziliensis</i>	53
4.1.4. Efeito da depleção de ferro sobre a ultraestrutura de <i>L. (V.) braziliensis</i> ..	54
4.1.5. Efeito da depleção de ferro sobre o potencial de membrana mitocondrial de <i>L. (V.) braziliensis</i>	56

4.1.6. Efeito da depleção de ferro sobre a integridade da membrana celular de <i>L. (V.) braziliensis</i>	57
4.1.7. Análise da fragmentação do DNA nuclear de <i>L. (V.) braziliensis</i> após o tratamento com DIP	58
4.1.8. Efeito da depleção de ferro sobre a expressão proteica em <i>L. (V.) braziliensis</i> através de eletroforese 2D e espectrometria de massas (MALDI-MS/MS).....	60
4.1.9. Efeito da depleção de ferro sobre a expressão gênica em <i>L. (V.) braziliensis</i>	65
4.2. Efeito do quelante de ferro DIP sobre a captação de ferro e a função mitocondrial de <i>L. (V.) braziliensis</i>.....	66
4.2.1. Efeito da depleção de ferro sobre a concentração intracelular e extracelular do metal em <i>L.(V.) braziliensis</i>	66
4.2.2. Efeito da depleção de ferro sobre a concentração intracelular e extracelular de heme em <i>L.(V.) braziliensis</i>	68
4.2.3. Efeito da depleção de ferro sobre a expressão de genes relacionados com a captação do metal em <i>L. (V.) braziliensis</i>	70
4.2.4. Efeito da depleção de ferro sobre a expressão da enzima FeSOD em <i>L. (V.) braziliensis</i>	71
4.2.5. Efeito da depleção de ferro sobre a expressão de genes relacionados com a função mitocondrial em <i>L. (V.) braziliensis</i>	72
4.2.6. Efeito da depleção de ferro sobre o consumo de oxigênio em <i>L.(V.) braziliensis</i>	74
4.2.7. Efeito da depleção de ferro sobre a atividade da enzima citocromo C oxidase (complexo IV da cadeia de transporte de elétrons) de <i>L. (V.) braziliensis</i>	75
4.2.8. Efeito da depleção de ferro sobre a expressão proteica em <i>L. (V.) braziliensis</i> através de MED-FASP e espectrometria de massas (LC-MS/MS) ..	76
4.3. Avaliação das proteínas e peptidases secretadas por <i>L. (V.) braziliensis</i> durante a interação com matrizes de colágeno do tipo I.....	80
4.3.1. Análise por microscopia de varredura da interação de isolados de <i>L. (V.) braziliensis</i> durante a invasão de matrizes de colágeno 3D	80
4.3.2. Identificação das proteínas secretadas por <i>L. (V.) braziliensis</i> durante a invasão de matrizes de colágeno 3D.....	81
4.3.3. Classificação funcional das proteínas secretadas por <i>L. (V.) braziliensis</i> em meio de cultura ou durante a invasão de matrizes de colágeno 3D	82
4.3.4. Análise enzimográfica da secreção de <i>L. (V.) braziliensis</i> durante a invasão de matrizes de colágeno 3D.....	84
4.3.5. Identificação das peptidases secretadas por <i>L. (V.) braziliensis</i> durante a invasão de matrizes de colágeno 3D.....	85
5. DISCUSSÃO	87
6. CONCLUSÕES	98

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
8. ANEXOS	117



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITO DA DEPLEÇÃO DE FERRO SOBRE *Leishmania (Viannia) braziliensis*: UMA ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL, PROTEÔMICA E INTERAÇÃO COM MATRIZES DE COLÁGENO SINTÉTICAS

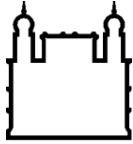
RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Camila Mesquita Rodrigues

Os protozoários do gênero *Leishmania* necessitam de ferro para gerar formas infectivas, colonizar as células hospedeiras e desenvolver lesões cutâneas em camundongos. O ferro também é essencial para a produção de energia através da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa. A presente tese teve como objetivos analisar o efeito da depleção de ferro sobre o crescimento celular, a ultraestrutura, a expressão proteica e a interação de *L. (V.) braziliensis* com matrizes de colágeno sintéticas. Nossos resultados demonstraram que a depleção de ferro interrompe a proliferação celular e compromete a ultraestrutura da mitocôndria. Este comprometimento é caracterizado pela diminuição da atividade do complexo IV que acarreta na redução do consumo de oxigênio e na despolarização do potencial de membrana mitocondrial. No entanto, enquanto alguns parasitos morrem devido à disfunção mitocondrial outros conseguem resistir ao estresse nutricional e sobreviver. Foi observado que os promastigotas aumentaram a expressão de RNAm dos transportadores de ferro (LIT1) e heme (LHR1) em meio depletado de ferro. Também foram detectados aumentos na expressão proteica de LIT1 e da enzima ferro-redutase (LFR1). Provavelmente, a elevação da expressão dos transportadores possibilita o aumento ou a manutenção da concentração intracelular do metal dos parasitos, contribuindo para sua sobrevivência. O aumento na expressão do RNAm da ferro superóxido dismutase (FeSOD) também deve desempenhar um importante papel na resistência dos parasitos ao estresse oxidativo causado pela depleção de ferro. Durante a interação com as matrizes de colágeno, foi observado que as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* fazem contato com as fibras tanto pelo flagelo quanto pelo corpo celular, mas o remodelamento das mesmas devido à ação dos parasitos se inicia após períodos de incubação maiores. O perfil enzimático das secreções em meio condicionado e durante a interação com matrizes de colágeno 3D se revelou idêntico, indicando que o colágeno não modula o perfil proteolítico de *L. (V.) braziliensis*. No entanto, as metalopeptidases provavelmente contribuem para a degradação da matriz, pois uma delas foi identificada diretamente do halo de atividade enzimática sugerindo que é uma das enzimas ativas responsáveis pela degradação do substrato.

Palavras chave: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, depleção de ferro, disfunção mitocondrial, transportadores de ferro proteoma, matrizes de colágeno sintéticas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**EFFECT OF IRON DEPLETION ON *Leishmania (Viannia) braziliensis*:
ULTRASTRUCTURE, PROTEOMICS AND INTERACTION WITH SYNTHETIC
COLLAGEN MATRICES**

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Camila Mesquita Rodrigues

Leishmania protozoan parasites need iron to generate infective forms, colonize host cells and develop skin lesions in mice. Iron is also essential for the production of energy through the electron transport chain and the oxidative phosphorylation. This thesis aimed to analyze the effect of iron depletion on the cell growth, ultrastructure, protein expression and interaction of *L. (V.) braziliensis* with synthetic collagen matrices. Our results showed that iron depletion stops cell proliferation and impairs mitochondrial ultrastructure. This impairment is characterized by decreased activity of the electron transport chain complex IV which leads to both the reduction of oxygen consumption and the depolarization of mitochondrial membrane potential. However, while some parasites die due to mitochondrial dysfunction, others can resist nutritional stress and survive. It was observed that promastigotes increased mRNA expression of iron (LIT1) and heme (LHR1) transporters in iron depleted medium. The parasites also showed increased LIT1 and iron ferric reductase (LFR1) protein levels. Probably, the increased expression of transporters can enhance or maintain the intracellular concentrations of the metal, contributing to the parasites' survival. The increased expression of iron superoxide dismutase (FeSOD) mRNA should also play an important role on the parasites' resistance to oxidative stress caused by iron depletion. During the interaction with collagen matrices it was observed that *L. (V.) braziliensis* promastigotes make contact with the fibers by both the flagellum and the cellular body, but their remodeling due to the action of parasites may start after longer periods of incubation. Also, the peptidases secreted in the conditioned medium and during the interaction with 3D collagen matrices exhibited identical profiles showing that collagen does not modulate the proteolytic profile of *L. (V.) braziliensis*. However, metallopeptidases probably contribute to matrix degradation because one was identified directly from the enzymatic halo suggesting that it is an active enzyme responsible for the degradation of the substrate.

Keywords: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, iron depletion, mitochondrial dysfunction, iron transporters, proteome, synthetic collagen matrices.

LISTA DE ABREVIATURAS

2D: bidimensional

3D: tridimensional

40S: Putative 40S ribosomal protein S8

60S: Putative 60S acidic ribosomal protein P2 (LIP2)

$\Delta\psi_m$: potencial de membrana mitocondrial

ACN: acetonitrila

ACT: actina

ADP: adenosina bifosfato

AMP: adenosina monofosfato

AOX: oxidase alternativa

ATP: adenosina trifosfato

ATPs: ATP synthase F1 subunit gamma protein

BLASTN: Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide

CAL: putative calmodulin

CC: componente celular

cDNA: DNA complementar

CHAPS: (3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate)

CitB: Cytochrome b (Cytb) gene

CitC: Cytochrome c oxidase subunit IV

CLIOC: Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz

Da: dalton

DFO: desferrioxamina

DIP: 2,2-dipyridyl

DMT1: divalent metal transporter 1

DNA: ácido desoxirribonucleico

DR: declividade da reta

DTT: dithiothreitol

E: eficiência

EIF5a: Eukaryotic initiation factor 5a

FCCP: carbonil cianeto 4-(trifluoro-metoxi) fenildrazona

FDRs: sigla em inglês para "False Discovery Rate"

FEN: 1,10-fenantrolina

FeSOD: ferro superóxido dismutase

FLP: proteína frataxina like
FM: função molecular
GPI: glicosilfosfatidilinositol
GIPs: glicoinositol fosfolipídeos
GOEx: Gene Ontology Explorer
GPx: glutationa peroxidase
GP63: glicoproteína de superfície ou leishmanolisina
GTP: guanosina trifosfato
HCD: Higher-energy collisional dissociation
HIV: vírus da imunodeficiência humana
HRG-1: sigla em inglês para “heme responsive gene 1”
HRG-4: sigla em inglês para heme responsive gene 4
IEF: focalização isoelétrica
IRE: elemento responsivo ao ferro
IRP1: proteína reguladora do ferro 1
IRP2: proteína reguladora do ferro 2
IC50: Half Inhibitory Concentration
ISC: sigla em inglês para “iron sulfur cluster system”
IV: índice de variação
kDa: kilodalton
kDNA: DNA do cinetoplasto
LABCG5: sigla em inglês para “Leishmania ATP-binding cassette protein G5”
LC-MS/MS: Liquid chromatography–mass spectrometry
LPG: lipofosfoglicana
LFR1: Leishmania ferric reductase 1
LHR1: Leishmania heme transporter 1
LIT1: Leishmania iron transporter 1
LMIT1: Leishmania mitochondrial iron transporter 1
LT: Leishmaniose tegumentar
LV: Leishmaniose visceral
LysC: lisil endopeptidase
MALDI-MS/MS: Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight
MC: mediana do controle
MEC: matriz extracelular

MED-FASP: sigla em inglês para “Multi-Enzyme Digestion – Filter Aided Sample Preparation”

MHC: Complexo de histocompatibilidade

MS - Mass spectrometry (espectrometria de massas)

MS/MS - Tandem mass spectrometry (Espectrometria de massa em tandem)

MT: mediana do tratamento

NADH: nicotinamida adenina dinucleotideo

NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

NCBI - National Center for Biotechnology

ND: não detectado

NK: natural killer

NNN - Novy, McNeal e Nicolle

Nramp1: natural resistance-associated macrophage protein 1

Nramp2: natural resistance-associated macrophage protein 2

PB: processo biológico

PBS: Tampão fosfato-salino

PCR: reação cadeia polimerase

pI: Ponto Isoelétrico

Pi: fosfato inorgânico

PI: iodeto de propídeo

PKDL: Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (Leishmaniose Dérmica Pós Kala-azar)

PM: peso molecular

PPM: partes por milhão

qPCR: PCR quantitativo

R2: coeficiente de determinação

Rab5: sigla em inglês para “Ras-related protein 5”

Rab7: sigla em inglês para “Ras-related protein 7”

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

RNA_r: RNA ribossômico

RNA_t: RNA transportador

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

ROS: espécies reativas de oxigênio

Rp18: Putative ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor

RPM: rotações por minuto

SD: Putative succinate dehydrogenase flavoprotein
SDS: sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE: gel de eletroforese poliacrilamida sódio dodecil sulfato
SHAM: ácido salicilhidroxâmico
SOD: superóxido dismutase
TCA: ácido tricloroacético
TFA: ácido trifluoroacético
TfR1: receptor de transferrina 1
TdT: Terminal deoxynucleotidyltransferase
TMRE: tetrametilrodamina
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated fluorescein dUTP nick end labeling
TXNPx: triparedoxina peroxidase
UCEE2: Ubiquitin-conjugating enzyme E2 partial mRNA
UCP: proteína desacopladora
UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography
UTRs: regiões não traduzidas
WHO: sigla em inglês para “World Health Organization”

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais formas clínicas da infecção por <i>Leishmania spp.</i>	5
Tabela 2. Primers de qPCR utilizados durante a tese	40
Tabela 3: Análise do $\Delta\psi$ m das formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> por citometria de fluxo	57
Tabela 4. Proteínas de que sofreram redução em sua expressão em meio depletado de ferro	61
Tabela 5. Proteínas de que sofreram aumento ou redução em sua expressão em meio depletado de ferro segundo o método MED-FASP LC-MS/MS	79
Tabela 6. Peptidases identificadas diretamente nas bandas de degradação proteolítica em gel enzimográfico	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo do ciclo evolutivo de <i>Leishmania</i> .	5
Figura 2. Representação esquemática das principais organelas de <i>Leishmania</i> .	10
Figura 3. Esquema da possível cadeia de transporte de elétrons em <i>Leishmania</i> .	14
Figura 4. Regulação do metabolismo sistêmico do ferro nos mamíferos.	19
Figura 5. Representação esquemática das vias de aquisição de ferro em <i>Leishmania</i> .	27
Figura 6. Representação do quelante de ferro 2,2-dipyridyl (DIP)	32
Figura 7. Efeito da depleção de ferro sobre a curva de crescimento dos promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	51
Figura 8. Citotoxicidade do quelante de ferro DIP sobre os promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> após 24 e 48 h de cultivo.	52
Figura 9. Reversibilidade do efeito do quelante de ferro DIP sobre a proliferação de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	53
Figura 10. Efeito da depleção de ferro sobre a ultraestrutura dos promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	55
Figura 11. Análise da integridade da membrana plasmática dos promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> por citometria de fluxo.	56
Figura 12. TUNEL.	59
Figura 13. Géis 2D contendo proteínas solúveis de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	61
Figura 14. Ampliações das regiões dos géis contendo proteínas diferencialmente expressas nos parasitos cultivados na presença do quelante de ferro DIP.	62
Figura 15. Níveis de expressão do RNAm em promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> cultivados na ausência (controle) e na presença de 100 μ M de DIP por 24 h.	65
Figura 16: Quantificação do ferro intracelular.	67
Figura 17: Quantificação do ferro extracelular.	68
Figura 18: Quantificação do heme intracelular.	69
Figura 19: Quantificação do heme extracelular.	69
Figura 20. Níveis de expressão do RNAm dos transportadores de ferro (LIT1) e de heme (LHR1)	71

Figura 21. Níveis de expressão do RNAm da enzima antioxidante FeSOD.	72
Figura 22. Níveis de expressão do RNAm dos genes relacionados com a função mitocondrial.	73
Figura 23. Consumo de oxigênio por promastigotas intactos de <i>L. (V.) braziliensis</i> .	75
Figura 24. Atividade da enzima citocromo C oxidase (complexo IV).	76
Figura 25. Microscopia eletrônica de varredura da invasão de matrizes sintéticas de colágeno por <i>L. (V.) braziliensis</i> .	80
Figura 26. Separação das proteínas secretadas por <i>L. (V.) braziliensis</i> em meio de cultura e durante a invasão de matrizes de colágeno 3D.	82
Figura 27. Classificação funcional das proteínas identificadas na secreção de <i>L. (V.) braziliensis</i> em meio RPMI segundo o Gene Ontology.	83
Figura 28. Classificação funcional das proteínas identificadas na secreção de <i>L. (V.) braziliensis</i> durante a interação com as matrizes 3D segundo o Gene Ontology.	84
Figura 29. Separação das peptidases secretadas por <i>L. (V.) braziliensis</i> em meio de cultura e durante a invasão de matrizes de colágeno 3D.	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

A leishmaniose, infecção causada por protozoários do gênero *Leishmania*, apresenta uma incidência global de 1,6 milhões de casos por ano (Alvar *et al.*, 2012). A leishmaniose é endêmica em 98 países e três territórios onde 350 milhões de pessoas estão sob o risco de serem infectadas (Alvar *et al.*, 2012). A doença está distribuída nos trópicos e sub-trópicos do continente americano, na África, Índia, Rússia, Centro e Leste Asiático e em alguns países do sul da Europa (WHO, 2010).

Estimativas sugerem que a leishmaniose é responsável por cerca de 20 a 40 mil mortes anuais no mundo (Alvar *et al.*, 2012). No entanto, o número de casos não relatados pode ser maior devido à sub-notificação e a casos de infecção assintomática em indivíduos aparentemente saudáveis (WHO, 2010). A OMS classifica a leishmaniose como uma doença negligenciada e também a considera como a nona doença infecciosa mais relevante do mundo (WHO, 2010). Cerca de 0,7 a 1,2 milhões de casos de leishmaniose tegumentar (LT) ocorrem todos os anos. Atualmente um grupo de dez países formado por Afeganistão, Argélia, Etiópia, Sudão, Irã, Síria, Costa Rica, Colômbia, Peru e Brasil concentra cerca de 70% dos casos de LT em todo o mundo (Alvar *et al.*, 2012). No continente americano a LT constitui um grave problema de saúde pública, apresentando cerca de 67 mil novos casos por ano dos quais 30 mil ocorrem no Brasil (Alvar *et al.*, 2012). Com relação à leishmaniose visceral, 0,2 a 0,4 milhões de casos ocorrem anualmente em todo o mundo (Alvar *et al.*, 2012). Deste total, mais de 90% dos casos ocorrem em um grupo de seis países formado por Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. Durante o período de 2004 a 2008 o número de casos de LV atingiu a média anual de 3481 casos no Brasil, o que corresponde a 95% do total do continente americano (Alvar *et al.*, 2012). A coinfeção com o HIV intensifica o número de casos de leishmaniose cutânea e visceral causando manifestações clínicas graves e difíceis de tratar. Até março de 2010, os casos de coinfeção entre *Leishmania* e HIV foram reportados em 35 dos 98 países endêmicos (WHO, 2010).

Cerca de 30 espécies de *Leishmania* já foram descritas, sendo que 20 destas são capazes de infectar humanos. Dentre 800 espécies de flebotomíneos conhecidas, 93 possuem competência vetorial (WHO, 2010). Diversos animais silvestres tais como roedores, marsupiais, edentados e canídeos são considerados os principais reservatórios do parasito (Grimaldi e Tesh, 1993). No entanto, como consequência do desflorestamento e da urbanização, os ciclos de transmissão da leishmaniose estão se adaptando aos ambientes peridomésticos e sendo introduzidos em áreas que não eram consideradas endêmicas. Deste modo, os animais domésticos tornaram-se sanguíneos mais frequentes em humanos (Murray *et al.*, 2005; Reithinger *et al.*, 2007; WHO, 2010).

A leishmaniose possui um amplo espectro de manifestações clínicas que variam desde lesões cutâneas simples até infecções difusas, disseminadas, mucocutâneas e viscerais (Tabela 1). O estabelecimento da infecção e o desenvolvimento dos sintomas da doença dependem da espécie de *Leishmania* envolvida, da resposta imunológica do hospedeiro e da biologia do vetor (Murray *et al.*, 2005; Reithinger *et al.*, 2007). O controle da leishmaniose é dificultado pelas limitações intrínsecas dos medicamentos usados no tratamento e pelo alto custo financeiro, bem como pelo crescente número de casos de coinfeção com o HIV e pela ausência de uma vacina eficaz (Murray *et al.*, 2005; Reithinger *et al.*, 2007).

Tabela 1. Principais formas clínicas da infecção por *Leishmania spp.*

Forma clínica	Manifestação clínica	Principais espécies associadas
<i>Cutânea</i>	Lesão única ou lesões múltiplas que, dependendo da espécie infectante, podem ser pápulos, nódulos, nódulos ulcerados ou lesões ulceradas.	<i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) panamensis</i> , <i>L. (V.) guyanensis</i> , <i>L. (V.) peruviana</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (L.) tropica</i> , <i>L. (L.) major</i> , <i>L. (L.) aethiopica</i> , <i>L. (L.) infantum</i> .
<i>Mucosa</i>	Disseminação dos parasitos da lesão cutânea para a mucosa oro - nasal e faríngea por via linfática ou sanguínea.	<i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) panamensis</i> , <i>L. (L.) aethiopica</i> , <i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (L.) tropica</i> , <i>L. (L.) major</i> , <i>L. (L.) donovani</i> .

<i>Cutânea Disseminada</i>	Múltiplas lesões ulceradas acneiformes, papulares e nodulares em áreas não contíguas do corpo podendo ou não haver comprometimento das mucosas.	<i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) panamensis</i> , <i>L. (V.) guyanensis</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> .
<i>Cutânea Difusa</i>	Múltiplas lesões não ulceradas podendo ocorrer sob a forma de pápulos, nódulos ou placas.	<i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L. (L.) aethiopica</i> .
<i>Visceral</i>	Comprometimento do sistema reticulo - endotelial (baço, fígado, mucosa intestinal, medula óssea e linfonodos) seguido de febre, anemia, diarreia e perda de peso.	<i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (L.) donovani</i>
<i>Pós Kala-azar (PKL)</i>	Lesões papulares ou nodulares e despigmentação da pele.	<i>L. (L.) donovani</i>

1.2. O ciclo evolutivo de *Leishmania* spp.

Os protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* são parasitos unicelulares que apresentam um ciclo evolutivo heteroxeno desenvolvendo-se entre insetos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem. No trato digestório do hospedeiro invertebrado, o protozoário apresenta formas flageladas denominadas promastigotas. No hospedeiro vertebrado, por sua vez, encontram-se as amastigotas, formas arredondadas e sem flagelo livre.

O ciclo evolutivo de *Leishmania* se inicia quando uma fêmea de flebotomíneo realiza seu repasto sanguíneo em um mamífero infectado e ingere sangue contendo as formas amastigotas do parasito. Como o aparelho bucal dos flebotomíneos é curto e rígido, esses insetos não conseguem se alimentar de sangue diretamente nos vasos sanguíneos (Bates, 2007). Por essa razão, as fêmeas dilaceram a pele do hospedeiro e formam uma poça subcutânea contendo sangue e restos de tecido. O dano tecidual gerado libera macrófagos ou amastigotas da derme para a poça de sangue, que é ingerida pelo inseto (Bates, 2007). No intestino do vetor, o pH básico e a temperatura de 25 °C induzem a diferenciação dos amastigotas em promastigotas procíclicos. Contudo, o desenvolvimento das formas promastigotas de *Leishmania* no inseto difere dependendo do subgênero ao qual o parasito pertence (Pearson e

Sousa, 1996). Dentro do subgênero *Viannia*, os promastigotas se multiplicam no intestino posterior do inseto e, em seguida, migram para o intestino médio e anterior. Por outro lado, dentro do subgênero *Leishmania*, os promastigotas se multiplicam diretamente no intestino médio e anterior (Pearson e Sousa, 1996). Depois que atingem a região da válvula do estomodeu, no intestino anterior, os promastigotas continuam a se multiplicar além de produzir e secretar um gel de constituição glicoproteica (Rogers *et al.*, 2002). Enquanto produzem o gel, os promastigotas procíclicos sofrem metaciclogênese e se diferenciam em promastigotas metacíclicos, que são altamente infectivos para os mamíferos (Rogers *et al.*, 2002). Ao mesmo tempo, o gel obstrui parte do intestino médio e o intestino anterior do inseto, chegando à região da faringe (Rogers *et al.*, 2002). A obstrução do tubo digestório gera uma pressão que leva a fêmea do flebotomíneo a regurgitar o gel secretório na derme do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, liberando os promastigotas metacíclicos na derme do hospedeiro vertebrado (Rogers *et al.*, 2002).

Os promastigotas metacíclicos, que são formas resistentes à lise pelo complemento, migram através da matriz extracelular e penetram em células do sistema fagocítico mononuclear através de fagocitose mediada por receptores. Embora os parasitos possam se desenvolver em diversos tipos celulares tais como neutrófilos, células dendríticas e fibroblastos, a infecção se propaga principalmente no interior dos macrófagos. Os promastigotas metacíclicos aderem à superfície celular dos macrófagos através do flagelo ou do corpo celular. A adesão envolve o reconhecimento de moléculas expostas na membrana celular dos parasitos tais como as lipofosfoglicanas e a glicoproteína GP63 (Russel e Wilhelm, 1986; Turco e Descoteaux, 1992). Estas moléculas ligam-se aos receptores de complemento, manose e fibronectina presentes na superfície dos macrófagos, que internalizam os promastigotas em vacúolos parasitóforos (revisado por Ueno e Wilson, 2012). O pH ácido dos vacúolos parasitóforos somado a outros fatores tais como a temperatura de 37 °C e a restrição de nutrientes, induzem a diferenciação dos promastigotas metacíclicos em amastigotas. A intensa multiplicação dos amastigotas no interior dos vacúolos parasitóforos acarreta no rompimento da membrana celular dos macrófagos. De volta à corrente sanguínea, os amastigotas podem

infectar outros macrófagos ou serem ingeridos por uma nova fêmea de flebotomíneo, reiniciando o ciclo.

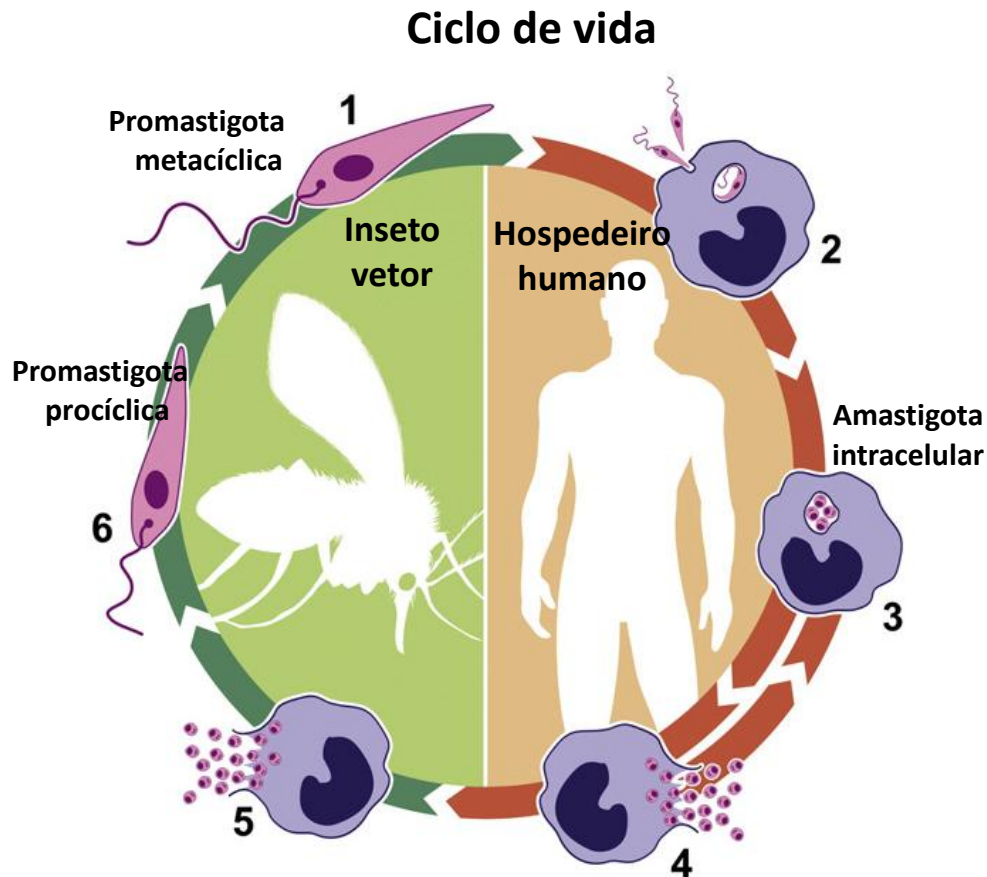


Figura 1. Esquema ilustrativo do ciclo evolutivo de *Leishmania*. (Adaptado de Cuervo *et al.*, 2010) As formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* (1) são regurgitadas sobre a derme do hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo de uma fêmea de flebotomíneo infectada. As formas promastigotas metacíclicas são reconhecidas e fagocitadas por macrófagos (2). No interior dos vacúolos parasitóforos, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas (3) que se multiplicam por divisão binária. Ocorre a lise da membrana do macrófago e os parasitos infectam outras células do sistema fagocítico mononuclear (4). Durante novo repasto sanguíneo, os flebotomíneos ingerem, junto com o sangue do hospedeiro, macrófagos infectados (5). No intestino do inseto, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas proliferativas (6) que se desenvolvem no intestino do vetor e migram para a porção anterior do intestino como promastigotas metacíclicas, dando continuidade ciclo.

1.3. Morfologia e ultraestrutura dos protozoários do gênero *Leishmania*

Os protozoários do gênero *Leishmania* são células eucarióticas que pertencem à classe Kinetoplastea e a ordem Trypanosomatida. Diversas organelas presentes em *Leishmania* também são encontradas nas células dos mamíferos. No entanto, esses protozoários também possuem organelas que estão ausentes em outros organismos eucarióticos sendo encontradas somente nos tripanossomatídeos.

Ao longo do ciclo evolutivo, os protozoários do gênero *Leishmania* sofrem diferenciações que são acompanhadas por mudanças em sua morfologia e na posição relativa de algumas organelas (revisto em Gull, 1999). As formas promastigotas possuem corpo celular de aspecto fusiforme e alcançam 20 μM de comprimento e 4 μM de largura. As formas amastigotas, por sua vez, apresentam um corpo celular de contorno ovóide com 2 a 6 μM de comprimento e 1,5 a 3 μM de largura. Enquanto os promastigotas apresentam um flagelo longo, os amastigotas possuem um flagelo curto e interiorizado. Em ambas as formas evolutivas, o flagelo emerge de uma invaginação da membrana celular na base do flagelo, chamada bolsa flagelar. O flagelo é formado por um axonema típico de eucariotos, constituído por nove pares de microtúbulos periféricos e um par central conectados à estrutura paraflagelar em toda a sua extensão (Gull, 1999). A estrutura paraflagelar está presente em alguns grupos de eucariotos unicelulares sendo formada por um complexo arranjo de filamentos proteicos (Gull, 1999). O flagelo também está intimamente ligado ao corpúsculo basal que é o sítio de crescimento dos microtúbulos. Esta estrutura também se encontra associada à bolsa flagelar, à membrana mitocondrial externa e ao cinetoplasto através de seus filamentos unilaterais. Embora *Leishmania* apresente um flagelo que emerge da porção anterior do corpo celular, esses parasitos também possuem zonas de adesão flagelar que definem orientação da célula e de suas organelas citoplasmáticas durante as mudanças morfológicas que ocorrem no ciclo evolutivo (Wheeler *et al.*, 2016).

A membrana celular dos tripanossomatídeos é formada por proteínas, lipídeos e carboidratos, estes últimos distribuídos na face externa, formando o

glicocálix que recobre toda a superfície. O glicocálix tem como principal função a interação do parasito com a superfície das células dos hospedeiros: células epiteliais intestinais do vetor e células fagocíticas mononucleares nos mamíferos. LPG (lipofosfoglicana) e GP63 (glicoproteína de superfície ou leishmanolisina) são as principais moléculas de superfície nas formas promastigotas de *Leishmania* (McConville *et al.*, 2002). Ambas são ligadas à membrana celular por âncoras de GPI (glicosilfosfatidilinositol). Os amastigotas, por sua vez, têm sua superfície recoberta por moléculas de GPI livres e glicoesfingolipídeos do hospedeiro (McConville *et al.*, 2002).

Assim como nos mamíferos o retículo endoplasmático de *Leishmania* é formado por uma rede de membranas que pode apresentar morfologia tubular ou achatada. As principais funções do retículo endoplasmático incluem síntese, modificação e transporte de proteínas, síntese de lipídeos e armazenamento de cálcio (Sitia e Meldolesi, 1992). O retículo endoplasmático de *Leishmania* é o sítio de produção de ácidos graxos, glicolipídeos, âncoras de GPI e LPG de superfície (Lee *et al.*, 2007; McConville e Ferguson, 1993). As âncoras de GPI são adicionadas à extremidade C-terminal das proteínas que contêm um sinal de ligação, representando uma importante modificação pós-traducional no contexto da síntese de proteínas importantes para a virulência de *Leishmania* tais como a GP63, as LPGs e os glicoinositol fosfolipídeos (GIPLs) (McConville e Ferguson, 1993).

Estudos de microscopia eletrônica e reconstrução 3D revelaram que, ao contrário dos organismos pluricelulares, os tripanossomatídeos possuem uma única mitocôndria tubular, ramificada e periférica que se estende por todo o corpo celular do parasito (Simpson, 1972; Paulin 1975). Esta mitocôndria apresenta grande plasticidade podendo fragmentar-se e fundir-se alterando seu formato e sua distribuição de forma dinâmica pela célula (Bernard e Rossignol, 2008). A organela possui ainda uma região especializada que abriga um componente característico da Classe Kinetoplastea, o cinetoplasto. Como revelado por microscopia eletrônica, o cinetoplasto é constituído por filamentos densos de DNA dispostos em alças paralelas arrumadas em um ou dois planos (revisado por Schneider, 2001). O DNA do cinetoplasto (kDNA) constitui cerca de 30% do DNA total da célula sendo composto por 20 a 50 cadeias fechadas

em maxicírculos e 5 a 20 mil cadeias fechadas em minicírculos (revisado por Schneider, 2001). Os maxicírculos possuem estrutura e função semelhantes ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores, codificando um pequeno número de RNAr, RNAt e RNAm necessários para a síntese das proteínas que constituem os complexos respiratórios. Por outro lado, os minicírculos codificam pequenas moléculas de RNA guia que adicionam ou deletam resíduos de uridina dos transcritos dos maxicírculos em um processo conhecido como edição de RNA (Stuart e Panigrahi, 2002).

Em tripanossomatídeos, a duplicação de estruturas de cópia única (tais como mitocôndria, cinetoplasto e flagelo) ou mesmo a mudança no posicionamento das mesmas no interior da célula envolve processos de diferenciação ou divisão celular (Gull, 1999). Por esta razão, estes organismos possuem um citoesqueleto bastante organizado formado por uma rede de microtúbulos subpeliculares cujos filamentos conectam-se entre si e com a membrana celular do parasito, formando uma espécie de gaiola que envolve todo o citosol (Gull, 1999). Na extremidade anterior do parasito, a invaginação da membrana celular forma a bolsa flagelar, que estabelece um contato direto com a membrana do flagelo (De Souza, 2002; McConville *et al.*, 2002). A bolsa flagelar é a única região do parasito que não apresenta microtúbulos subpeliculares associados à membrana, sendo uma estrutura altamente especializada em endocitose e exocitose de moléculas (De Souza, 2002; McConville *et al.*, 2002). A endocitose de hemoglobina por *Leishmania* ocorre através de um receptor localizado na bolsa flagelar (Sengputa *et al.*, 1999). A secreção de cisteíno-peptidases, proteofosfoglicanas e fosfatases ácidas pelo parasito também ocorre nesta região (Stiehof *et al.*, 1994; McConville *et al.*, 2002). Os promastigotas de *Leishmania* contêm estruturas únicas em sua via endocítica. Os corpos multivesiculares são organelas delimitadas por membrana que armazenam diversas vesículas e as estruturas tubulares são grupamentos de túbulos localizados próximos ao complexo de Golgi e à bolsa flagelar (De Souza *et al.*, 2009). Finalmente, o sistema túbulo multivesicular se estende por todo o corpo celular do parasito sendo sustentado por microtúbulos e contendo vesículas de morfologia e tamanho heterogêneos (De Souza *et al.*, 2009). Nas formas amastigotas de *Leishmania* organelas semelhantes aos

lisossomos, denominadas megassomos, armazenam cisteíno-peptidases e fosfatases ácidas que são posteriormente secretadas através bolsa flagelar (Pupkins *et al.*, 1986; Antoine *et al.*, 1988; Duboise *et al.*, 1994). O tamanho e o número de megassomos no citoplasma podem variar de acordo com a espécie de *Leishmania* e o tipo de amastigota em questão. Os amastigotas axênicos, por exemplo, apresentam menor número de megassomos do que amastigotas derivados de lesões (Ueda-Nakamura *et al.*, 2007). O Golgi é único nos tripanosomatídeos e está localizado na porção anterior do corpo do parasito próximo a bolsa flagelar. Assim, como em outros eucariotos, participa do processo de glicosilação. Os ribossomos estão distribuídos por todo o citoplasma (De Souza *et al.*, 2009).

Os glicossomos são organelas citoplasmáticas esféricas e delimitadas por membrana sendo análogas aos peroxissomos dos eucariotos superiores. Todos os protozoários da Ordem Trypanosomatida possuem glicossomos, no entanto, a atividade da enzima catalase, responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio, só pode ser detectada com facilidade nos tripanossomatídeos monoxênicos tais como *Crithidia* e *Leptomonas* (Muse e Roberts, 1973; Souto-Padron e De Souza, 1982). Embora a atividade da catalase não seja significativa em tripanossomatídeos heteroxenos como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*, os glicossomos destes parasitos abrigam as primeiras sete do total de dez enzimas que compõem a via glicolítica (Michels *et al.*, 2006). Além disso, outros processos metabólicos tais como a via pentose-fosfato, a β -oxidação dos ácidos graxos, a síntese de purina e as vias biossintéticas de pirimidinas, esqualenos e éter-lipídios também ocorrem nos glicossomos destes protozoários (Michels *et al.*, 2006). Os peroxissomos dos mamíferos também abrigam várias enzimas que participam das vias metabólicas citadas acima, confirmando a relação destas organelas com os glicossomos dos tripanossomatídeos (De Souza, 2002).

Os acidocalcissomos são organelas encontradas em diversos organismos tais como bactérias, protozoários e diversas espécies de vertebrados, incluindo o homem (Docampo e Moreno, 2011). Em *Leishmania*, os acidocalcissomos foram inicialmente identificados como compartimentos de pH ácido que importavam Ca^{+2} devido à presença da enzima Ca^{+2} ATPase na

membrana das organelas (Lu *et al.*, 1997). Atualmente, sabe-se que além de Ca^{+2} os acidocalcissomos também armazenam fosfato, cátions (tais como Na, K, Mg, Zn e Fe) e pequenos aminoácidos (Docampo e Moreno, 2011). Estas organelas apresentam um conteúdo elétron-denso que pode ser visualizado de diferentes modos de acordo com o método de preparação da amostra antes da análise por microscopia eletrônica (De Souza, 2002). Nos procedimentos de rotina, parte do material elétron-denso pode ser removida, restando apenas uma pequena esfera adjacente à membrana (De Souza, 2002).

O núcleo dos tripanosomatídeos é estruturalmente semelhante à de outros eucariotos. Quanto à morfologia, o núcleo é arredondado e encontra-se na região central da célula tanto em promastigotas quanto em amastigotas. O envoltório nuclear é contínuo com o retículo endoplasmático e o nucléolo é observado na região central do núcleo (De Souza, 2002). As localizações das organelas descritas acima bem como as diferenças morfológicas entre promastigotas e amastigotas podem ser visualizadas na Figura 2.

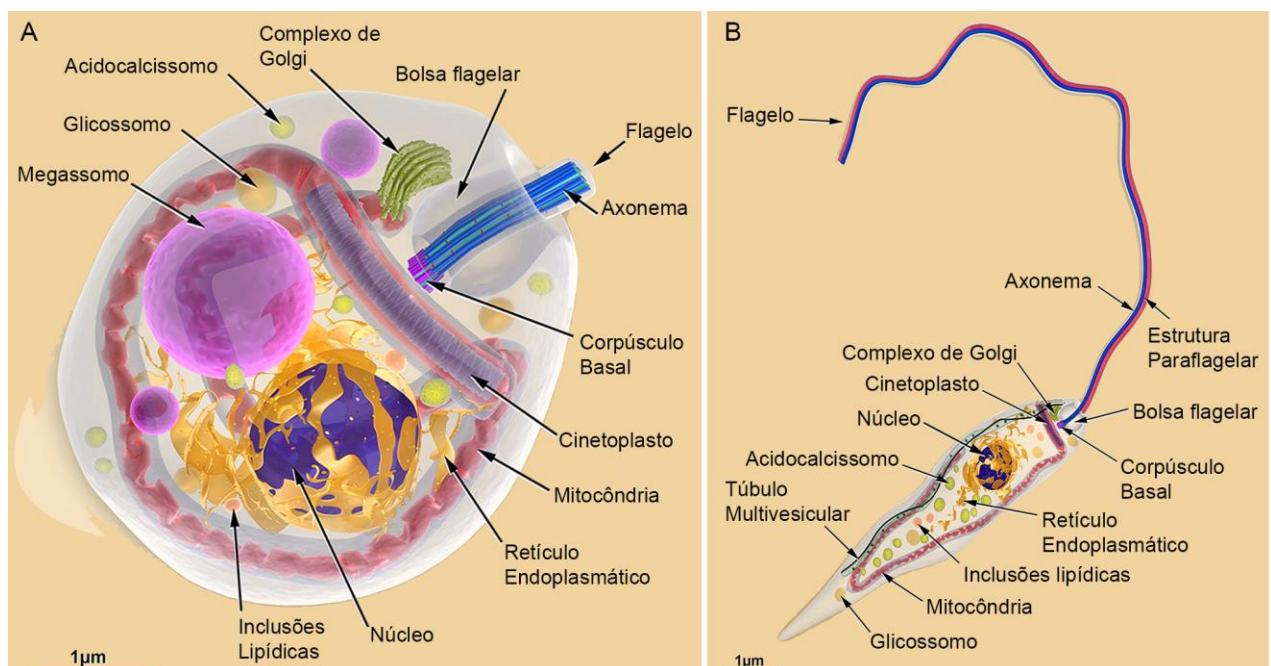


Figura 2. Representação esquemática das principais organelas de *Leishmania*. (A) forma amastigota e (B) forma promastigota. Adaptado de Teixeira *et al.*, 2013.

1.4. O papel da mitocôndria no metabolismo energético de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos

As mitocôndrias são organelas onde ocorrem processos fisiológicos essenciais. Um deles é a fosforilação oxidativa que gera a maior parte da energia consumida pelos organismos aeróbicos. Outras funções são atribuídas às mitocôndrias tais como a síntese e o catabolismo de aminoácidos essenciais, a oxidação de ácidos graxos e a formação de grupamentos Fe-S (revisado por Menna-Barreto e Castro, 2014). Assim como nos eucariotos superiores, a mitocôndria dos tripanossomatídeos é rodeada por uma dupla membrana que envolve a matriz mitocondrial. A membrana externa encontra-se em contato com o citoplasma enquanto a membrana interna é formada por invaginações denominadas cristas, que penetram a matriz mitocondrial. Entre as membranas externa e interna encontra-se o espaço intermembranar (De Souza *et al.*, 2009). A cadeia respiratória está localizada na membrana mitocondrial interna sendo formada por uma série de proteínas carreadoras contendo grupos prostéticos capazes de aceitar e doar elétrons. Quatro complexos enzimáticos constituem a cadeia de transporte de elétrons (Figura 3):

- Complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase): contém uma flavoproteína e em média seis centros Fe-S sendo responsável por catalisar a transferência de elétrons para a ubiquinona. Também é responsável pelo bombeamento de quatro prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, utilizando a energia da transferência de elétrons. É inibido pela rotenona;
- Complexo II (succinato-desidrogenase): é uma enzima do ciclo de Krebs ligada à membrana mitocondrial e possui o heme e centros Fe-S como grupos prostéticos. A transferência de elétrons ocorre através dos centros Fe-S para a ubiquinona. A ubiquinona reduzida tanto pelo complexo I quanto no complexo II se desloca ao longo da membrana interna mitocondrial, levando os elétrons até o complexo III. É inibido pela tenoiltrifluoroacetona;
- Complexo III (Ubiquinona-citocromo c-oxidoreductase): possui o heme e centros Fe-S como grupos prostéticos. Acopla a

transferência dos elétrons do ubiquinol para o citocromo c, com o transporte de quatro prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana e a restauração da ubiquinona. A ubiquinona doa um elétron para o citocromo c, que se difunde pela membrana até reduzir o complexo IV. É inibido pela antimicina A e pela tafenoquina;

- Complexo IV (Citocromo c-oxidase): possui o heme e centros de cobre como grupos prostéticos. Transfere elétrons do citocromo c para o O₂, reduzindo-o a H₂O, havendo também o bombeamento de dois prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. É inibido pelo cianeto de potássio (KCN).

A síntese de ATP ocorre essencialmente por meio da fosforilação oxidativa associada ao transporte de elétrons pela cadeia transportadora (complexos I-IV). Neste processo, a ATP sintase utiliza a força protomotriz gerada pelo gradiente eletroquímico entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial para sintetizar ATP a partir de ADP e Pi (revisado por Menna-Barreto e Castro, 2014) (Figura 3).

Embora apresente muitos pontos em comum, o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons dos tripanossomatídeos também possui peculiaridades com relação às células dos mamíferos. Os tripanossomatídeos utilizam quantidades significativas de succinato como doador primário de elétrons de modo que inibidores específicos de succinato desidrogenase inibem o consumo de oxigênio (Turrens, 1989; Denicola-Seoane, 1992; Hernandez e Turrens, 1998). A oxidação do succinato pelo complexo II é seguida pela transferência dos elétrons ao complexo III através da ubiquinona, como ocorre nos eucariotos superiores. No entanto, a presença de um complexo I funcional ainda é controversa. Em *L. (L.) donovani* a rotenona, inibidor específico da atividade de NADH-ubiquinona redutase, não reduziu o consumo de oxigênio mesmo quando presente em concentrações altas (Santhamma e Bhaduri, 1995; Mondal *et al.*, 2014). Uma proteína NADH desidrogenase insensível a rotenona foi isolada e caracterizada em *Trypanosoma brucei* sendo denominada NADH desidrogenase alternativa (Fang e Beattie, 2003). Esta proteína é capaz de transferir elétrons para vários

aceptores incluindo a ubiquinona O e o oxigênio podendo servir de complemento para a atividade do complexo I (Fang e Beattie, 2003). Ao realizar uma busca de similaridade no genoma de *L. (V). braziliensis* usando o programa BLASTN e uma sequência de NADH desidrogenase alternativa de *T. brucei* (GENBANK: AY125472) identificamos um RNAm (GENBANK: XM_001569128.1) que apresenta 64% de similaridade (Figura 3).

Outra particularidade da cadeia respiratória dos tripanossomatídeos é que o cianeto de potássio (KCN) não inibe completamente o consumo de oxigênio em *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. (L.) donovani* indicando a existência de uma oxidase terminal alternativa à citocromo oxidase. Esta oxidase alternativa (AOX) catalisa a redução do oxigênio livre em água. Ela encontra-se bem caracterizada em *T. brucei*, sendo essencial para a sobrevivência das formas tripomastigotas sanguíneas do parasito (Chauduri *et al.*, 2006; Shiba *et al.*, 2013). Em *T. brucei* e *T. cruzi* o consumo de oxigênio foi reduzido pelo ácido salicilhidroxâmico (SHAM) que é um inibidor específico da AOX (Chauduri *et al.*, 2006; Shiba *et al.*, 2013). No entanto, nenhum efeito do inibidor foi observado em *L. (L.) donovani*, reforçando que o papel exato da AOX precisa ser mais bem investigado neste tripanossomatídeo (Santhamma e Bhaduri, 1995) (Figura 3).

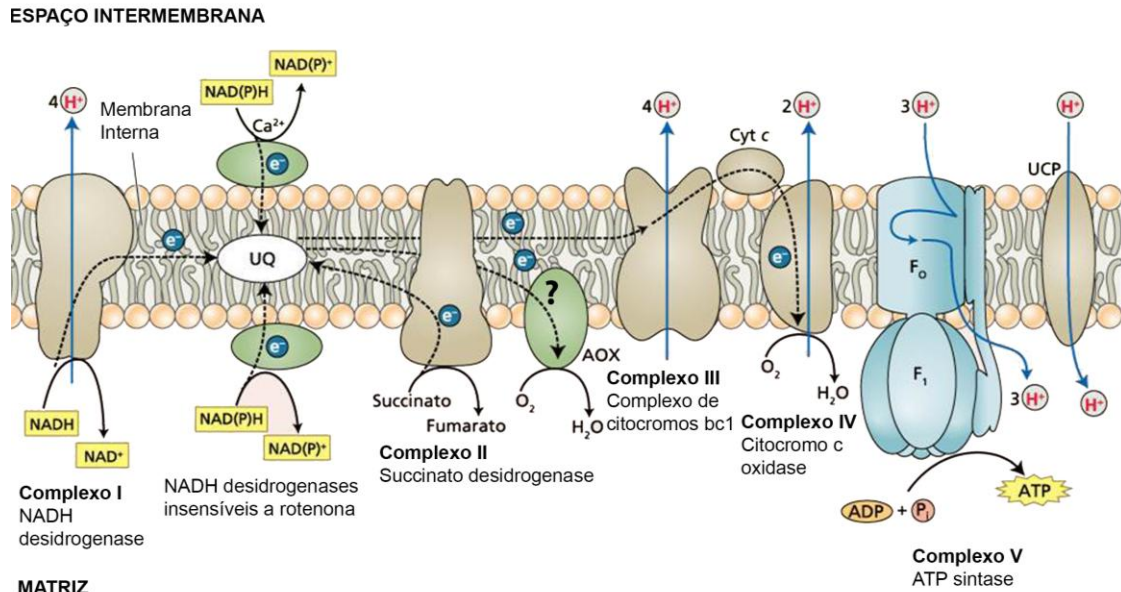


Figura 3. Esquema da possível cadeia de transporte de elétrons em *Leishmania*. Os quatro complexos enzimáticos (Complexos I-IV), a ATP sintase, as NADH desidrogenases insensíveis a rotenona e a proteína desacopladora (UCP) estão associadas à membrana interna da mitocôndria. A ubiquinona e o citocromo C carregam elétrons para reduzir os complexos III e IV respectivamente. A oxidase alternativa (AOX) está marcada com um ponto de interrogação (?) indicando a necessidade de melhor investigação do papel desta enzima em *Leishmania*. Observa-se a formação de um gradiente eletroquímico entre o espaço intermembranas e a matriz. Essa diferença de carga e pH gera a força protomotriz que é usada para a síntese do ATP. Imagem adaptada de Taiz e Zeiger (1998).

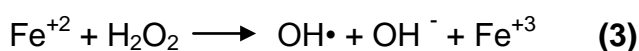
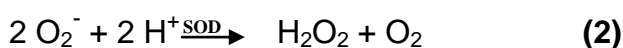
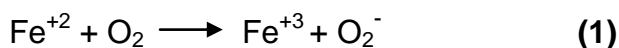
1.5. Geração de ROS e metabolismo oxidativo na mitocôndria de *Leishmania*

As espécies químicas formadas a partir da redução incompleta do oxigênio são denominadas ROS. Elas incluem o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot). As ROS possuem propriedades biológicas distintas como reatividade, meia-vida e solubilidade lipídica (D'Autréaux e Toledano, 2007). Em condições fisiológicas as ROS atuam como moléculas sinalizadoras que são essenciais para o crescimento e a diferenciação celular, mas quando presentes em quantidades elevadas podem causar diversos danos ao organismo. O radical hidroxila é um poderoso agente oxidante devido à capacidade de reagir com diversas moléculas biológicas incluindo aminoácidos, ácidos nucleicos e carboidratos. Além disso,

ele está associado à peroxidação lipídica que acarreta na destruição das membranas biológicas. O H_2O_2 e o O_2^- possuem alvos mais específicos oxidando preferencialmente proteínas que contêm o grupo prostético ferro-enxofre (Fe-S) em sua estrutura (D'Autréaux e Toledano, 2007).

Os complexos da cadeia de transporte de elétrons são os principais sítios de geração de ROS dos tripanossomatídeos (Tomás e Castro, 2013). Após o tratamento com os inibidores rotenona e tenoiltrifluoroacetona observou-se vazamento de elétrons e consequente liberação de ROS pelos complexos I e II de *L. (L.) donovani* (Mehta e Shaha, 2004). No mesmo parasito, a inibição do complexo III com antimicina A ou tafenoquina também estimulou a liberação de O_2^- (Mehta e Shaha, 2004; Carvalho *et al.*, 2010). O complexo IV, por sua vez, não é considerado uma fonte de ROS em tripanossomatídeos ou eucariotos superiores. Ainda assim, fatores intrínsecos ou drogas que reduzem a atividade do complexo IV também induzem à produção de ROS mitocondrial já que qualquer constrição no fluxo de elétrons favorece seu vazamento e reação com o O_2 (Tomás e Castro, 2013). Em *T. cruzi*, a diminuição na atividade do complexo IV aliada ao aumento da atividade dos complexos II e III está associada à geração de maiores níveis de ROS em tripomastigotas do que em epimastigotas (Gonçalves *et al.*, 2011).

A presença do ferro na mitocôndria aumenta a capacidade de geração de ROS por estas organelas. A redução da molécula de O_2 pelo íon ferroso (Fe^{+2}) durante a reação Haber-Weiss resulta na formação de O_2^- **(1)**. A enzima superóxido dismutase (SOD) tem ação antioxidante, catalisando a reação que converte O_2^- em H_2O_2 **(2)**. No entanto, a molécula de H_2O_2 pode ser reduzida pelo Fe^{+2} durante a reação de Fenton acarretando na produção de OH^- **(3)** (Aisen *et al.*, 2001).



Ao contrário dos mamíferos, que expressam superóxido dismutases dependentes de cobre, zinco e manganês, os protozoários do gênero *Leishmania* possuem superóxido dismutases cuja atividade depende exclusivamente do ferro. Quatro subtipos da FeSOD foram descritos nos tripanossomatídeos sendo encontrados em vários compartimentos celulares. As FeSOD A e C são encontradas na mitocôndria enquanto as FeSOD B1 e B2 são localizadas nos glicossomos (Taylor e Kelly, 2010; Tomás e Castro, 2013).

Os tripanossomatídeos não possuem os genes que codificam a glutathione redutase, a tioredoxina redutase, a catalase e diversas peroxidases compostas por selenocisteína (Tomás e Castro, 2013). No entanto, o H_2O_2 pode ser removido da mitocôndria por outras peroxidases tais como a citocromo C peroxidase, enzima dependente de ascorbato contendo um grupamento heme em sua constituição (Taylor e Kelly, 2010; Tomás e Castro, 2013). Outras enzimas responsáveis pela redução do H_2O_2 são a triparedoxina peroxidase (TXNPx) e a glutathione peroxidase (GPx) que são compostas por tióis (grupos -SH) de baixo peso molecular. Além disso, moléculas não enzimáticas tais como a tripanotona, a glutathione e cisteínas livres também são capazes de reduzir o H_2O_2 , equilibrando a proporção de ROS mitocondrial (Tomás e Castro, 2013).

1.6. Aquisição e transporte de ferro pelos mamíferos

A toxicidade do ferro é proveniente de sua atividade redox, por esta razão, os organismos que o utilizam precisam controlar seu transporte, metabolismo e armazenamento. Nos mamíferos, a grande maioria do ferro corporal é encontrada na hemoglobina dos eritrócitos. Quantidades significativas de ferro também estão presentes nos macrófagos, na mioglobina dos músculos e nos hepatócitos (Wang e Pantopoulos, 2011; Pantopoulos *et al.*, 2012). Embora possam perder ferro através da descamação das mucosas ou de sangramentos, os mamíferos não apresentam qualquer mecanismo regulado para sua excreção. Por outro lado, podem adquirir ferro a partir da alimentação ou da reciclagem do metal, que ocorre quando os macrófagos reticulo-endoteliais fagocitam e destroem eritrócitos senescentes (Ponka *et al.*,

1998). Devido à toxicidade do ferro e à sua insolubilidade em pH fisiológico, moléculas especializadas para aquisição, transporte e armazenamento do metal evoluíram a fim de suprir a demanda das células e do organismo como um todo.

O ferro adquirido na alimentação chega ao lúmen intestinal sob a forma de Fe^{+3} que é reduzido a Fe^{+2} pela enzima citocromo b redutase duodenal. O Fe^{+2} atravessa a membrana apical do enterócito através do transportador de cátions divalentes Nramp2 (sigla em inglês para “natural resistance-associated macrophage protein 2”) também denominado DMT1 (Gunshin et al., 1997; Fleming et al., 1997; McKie et al., 2001). Nos enterócitos, o Fe^{+2} pode ser estocado ou exportado para outros tecidos (Wang e Pantopoulos, 2011; Pantopoulos *et al*, 2012) (Figura 4). O efluxo do Fe^{+2} dos enterócitos para o plasma, seguido de sua reoxidação para Fe^{+3} , ocorre a partir da interação com a proteína ferroportina e a enzima ferroxidase hefaestina (Yeh *et al.*, 2009). De forma semelhante, a exportação de Fe^{+2} proveniente da reciclagem de eritrócitos é feita pelos macrófagos via ferroportina sendo seguida de reoxidação para Fe^{+3} pela proteína ceruplasmina (Wang e Pantopoulos, 2011; Pantopoulos *et al*, 2012) (Figura 4).

O fluxo de Fe^{+2} mediado pela ferroportina possui papel relevante para a manutenção da homeostase sistêmica do ferro. Este processo é negativamente regulado pela hepcidina, hormônio produzido no fígado capaz de se ligar à ferroportina e promover sua fosforilação, internalização e degradação lisossomal (Figura 4). A transcrição da hepcidina é estimulada pela presença de citocinas inflamatórias ou de uma sobrecarga de ferro no plasma resultando em uma redução da exportação de Fe^{+2} proveniente de enterócitos e macrófagos. Considerando que há uma correlação entre a secreção de citocinas e a ação da hepcidina, é provável que durante uma infecção o hormônio contribua para limitar o acesso dos patógenos extracelulares ao ferro, controlando a multiplicação e a sobrevivência dos mesmos. Contudo, parasitos intracelulares podem ser beneficiados pela ação da hepcidina uma vez que o hormônio limita o efluxo do ferro estocado nos macrófagos. A transcrição da hepcidina é inibida em condições de hipóxia e anemia possibilitando um

aumento do efluxo de Fe^{+2} dos enterócitos e macrófagos para o plasma (Nemeth e Ganz, 2009; Pantopoulos *et al*, 2012).

No plasma, o ferro é transportado como Fe^{+3} acoplado à glicoproteína carreadora transferrina (Figura 4). A transferrina, associada ao Fe^{+3} , se liga com alta afinidade ao receptor TfR1 (sigla em inglês para transferrin receptor 1) expresso na superfície das células e o complexo é internalizado por endocitose (Figura 4). À medida que o pH do endossomo se acidifica, a transferrina perde a afinidade pelo Fe^{+3} sendo reciclada para a superfície celular juntamente com seu receptor. De maneira concomitante, o íon Fe^{+3} é reduzido a Fe^{+2} e transportado para o citosol através do transportador de cátions divalentes Nramp2 situado na membrana do endossomo (Ponka *et al.*, 1998).

Vários tipos celulares apresentam ferro citosólico livre associado a quelantes de baixo peso molecular como citrato, ATP, AMP e pirofosfato. Embora seja uma fonte para utilização metabólica imediata, o ferro citosólico livre possui atividade redox ativa, podendo catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio (Breuer *et al.*, 2008). O ferro pode ser estocado e detoxificado pela proteína ferritina no citosol. A expressão da ferritina e do receptor de transferrina TfR1 possui regulação pós-transcricional na qual as proteínas reguladoras de ferro (IRP1 e IRP2) se associam aos elementos responsivos ao ferro (IRE) presentes nas regiões não traduzidas (UTRs) de seus respectivos RNAm. Quando há uma redução do ferro intracelular, as IRPs associam-se ao IRE presente no RNAm do receptor de transferrina TfR1. Conseqüentemente há um aumento da captação de Fe^{+3} ligado a transferrina, que acarreta em uma elevação na quantidade de ferro intracelular. Por outro lado, quando há abundância de ferro intracelular, as proteínas IRP1 e IRP2 perdem sua afinidade pelo IRE, acarretando na degradação do RNAm do receptor de transferrina TfR1 e na transcrição do RNAm da ferritina (Wallander *et al.*, 2006).

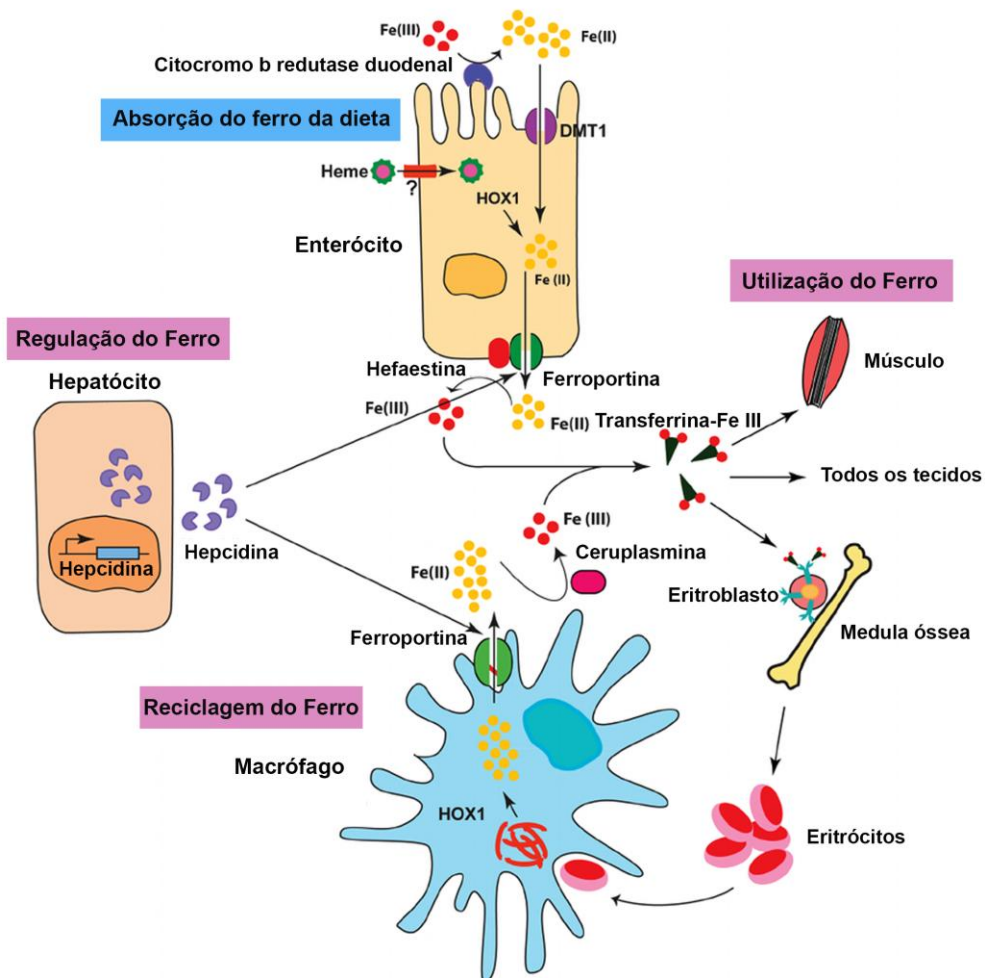


Figura 4. Regulação do metabolismo sistêmico do ferro nos mamíferos. O ferro da dieta chega ao lúmen intestinal sob a forma de Fe^{+3} que é reduzido a Fe^{+2} pela enzima citocromo b redutase duodenal e absorvido pelo DMT1. Por sua vez, os macrófagos esplênicos obtêm ferro pela reciclagem de eritrócitos senescentes. Enterócitos e macrófagos exportam o Fe^{+2} através da ferroportina. No meio extracelular o Fe^{+2} é reoxidado a Fe^{+3} pelas enzimas hefaestina e ceruplasmina. A transferrina se liga ao Fe^{+3} no plasma e distribui o metal para todos os tecidos. A hepcidina regula o efluxo de ferro das células regulando a estabilidade da ferroportina. A síntese e a secreção de hepcidina pelos hepatócitos são influenciadas pelos níveis de ferro no organismo e por condições que afetam indiretamente o metabolismo do metal tais como as inflamações. Imagem adaptada de Pantopoulos *et al* (2012).

1.7. Importância do ferro durante os processos infecciosos por protozoários

Nos mamíferos o ferro encontra-se acoplado a proteínas quelantes tais como transferrina, hemoglobina e ferritina. Além de protegerem o organismo contra o dano oxidativo causado pelo ferro livre, estas proteínas também limitam o acesso dos patógenos ao metal. Sendo assim, os microorganismos precisam competir pelo ferro associado às proteínas quelantes para estabelecer a infecção. Durante o curso da evolução, os protozoários ocuparam os mais diversos nichos de seus hospedeiros e desenvolveram mecanismos para explorar o ferro e outros recursos nutricionais necessários a sua sobrevivência (Wilson e Britigan, 1998; Schaible e Kaufman, 2004).

O ferro é um nutriente essencial para o crescimento de *Plasmodium falciparum*. Estudos prévios demonstraram que a privação de ferro induzida pelo quelante desferrioxamina (DFO) inibe o crescimento de trofozoítos tardios e esquizontes primários *in vitro*. Estes estágios do desenvolvimento sofrem alterações ultraestruturais decorrentes da carência de ferro, apresentando rompimento do envelope nuclear e vacuolização do nucleoplasma. (Atkinson *et al.*, 1991). A privação de ferro por DFO também inibe o crescimento de *P. falciparum in vivo*, reduzindo temporariamente a parasitemia em pacientes sintomáticos e assintomáticos embora não seja capaz de evitar a recrudescência da infecção (Gordeuk *et al.*, 1993).

A privação de ferro possui efeito inibitório sobre a multiplicação das formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos cultivados *in vitro* (Loo e Lalonde, 1984). Adicionalmente, estudos realizados com camundongos *in vivo* indicam que a administração de dietas pobres em ferro e o tratamento de longa duração com o quelante DFO (iniciando 14 dias antes e continuando após 21 dias da infecção) são capazes de reduzir a parasitemia e a mortalidade em infecções por *T. cruzi* (Lalonde e Holbein, 1984; Arantes *et al.*, 2007). A combinação do tratamento com DFO e benznidazole também demonstrou alta eficácia, além de não induzir a mortalidade nos camundongos (Francisco *et al.*, 2008). Porém, outros autores demonstraram que tratamentos de curta duração com o DFO, iniciando cinco dias após a infecção, não

reduziram a infecção por *T. cruzi* em camundongos (Pedrosa *et al.*, 1990). Um estudo mais recente indicou que o tratamento com DFO inibe o crescimento e reduz a mobilidade das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, sendo observada apoptose somente em uma pequena parcela da população. Além de controlar a infecção, o tratamento com DFO não apresenta efeitos colaterais para as células hospedeiras, não interferindo no metabolismo de ferro nas mesmas.

Trichomonas vaginalis, parasito do trato urogenital humano, necessita de grande quantidade de ferro exógeno para sobreviver, realizando endocitose de células epiteliais e eritrócitos para obter o metal acoplado à lactoferrina, hemoglobina, heme e ferritina. O cultivo de *T. vaginalis* em meio depletado de ferro inibe o crescimento celular e induz alterações morfológicas nos trofozoítos que internalizam seus flagelos e axóstilo passando a apresentar formato arredondado (pseudocisto). A mudança na morfologia do parasito é acompanhada por alterações na expressão de proteínas como a actina (De Jesus *et al.*, 2007). Diversas proteínas do hidrogenossomo também tiveram sua expressão alterada em meio depletado de ferro (Beltran *et al.*, 2013). Foi demonstrado que a privação do metal aumenta a expressão de proteínas da maquinaria de biossíntese ISC “*iron sulfur cluster system*” enquanto reduz a expressão de proteínas da via do catabolismo do piruvato, que contêm grupamentos Fe-S em sua estrutura (Beltran *et al.*, 2013). Diversas propriedades patogênicas de *T. vaginalis* também são moduladas pelo ferro tais como síntese de adesinas (Lehker *et al.*, 1991) resistência a lise pelo complemento (Alderete *et al.*, 1995), expressão de peptidases (Ryu *et al.*, 2001) e citoaderência (Lehker *et al.*, 1991). O ferro também é um importante fator de virulência para *Tritrichomonas foetus*, agente etiológico da tricomoníase bovina. Neste parasito, a privação do metal induz a uma diminuição da citotoxicidade e da expressão de cisteína peptidases (Melo-Braga *et al.*, 2003). De forma semelhante, a citotoxicidade e a aderência de *Entamoeba histolytica* às células hospedeiras também são moduladas por ferro (Lee *et al.*, 2008).

1.8. Aquisição, transporte e importância do ferro para a infecção por *Leishmania*

A infecção por *Leishmania* tem início quando uma fêmea de flebotomíneo inocula o hospedeiro mamífero com formas promastigotas metacíclicas do parasito. Em pouco tempo os promastigotas diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se no interior dos fagolisossomos dos macrófagos. Embora os fagolisossomos sejam um ambiente hostil, os amastigotas de *Leishmania* desenvolveram mecanismos que permitem resistir ao pH ácido e captar do hospedeiro os nutrientes essenciais à sua sobrevivência. Um desses nutrientes é o ferro que pode ser adquirido sob a forma de ferro inorgânico ou acoplado a porfirinas como o heme e a hemoglobina.

A identificação do transportador de cátions divalentes Nramp1 (sigla em inglês para “natural resistance-associated macrophage protein 1”) foi uma das primeiras evidências de que os protozoários do gênero *Leishmania* dependem do ferro para a sobrevivência e a replicação no meio intracelular (Vidal *et al.*, 1995; Blackwell *et al.*, 2001). A deleção dos alelos do gene que codifica o Nramp1 aumenta a susceptibilidade de camundongos a patógenos intracelulares como *Salmonella* spp, *Mycobacterium* spp e *Leishmania* spp (Vidal *et al.*, 1995; Blackwell *et al.*, 2001). Localizado na membrana dos endossomos tardios e lisossomos dos macrófagos, o Nramp1 transfere o Fe^{+2} do interior destas organelas para o citosol da célula hospedeira de modo que para ter uma infecção bem sucedida, os parasitos precisam competir com o hospedeiro pelo ferro que é internalizado através de endocitose (Vidal *et al.*, 1995; Blackwell *et al.*, 2001). Os primeiros estudos sobre a aquisição do ferro por *Leishmania* investigaram proteínas que poderiam atuar como receptores de transferrina. Voyiatzaki e Soteriadou (1992) utilizaram a transferrina humana como sonda e identificaram por Western Blot uma proteína de membrana de 70 kDa capaz de ligar-se à transferrina. No entanto, ensaios posteriores demonstraram que este receptor de 70 kDa também pode se associar à lactoferrina e à albumina sugerindo que se tratava de uma ligação inespecífica (Wilson e Britigan, 1998; Wilson *et al.*, 2002). Outros estudos avaliaram as fontes de ferro necessárias para o desenvolvimento do parasito. Foram

realizados experimentos utilizando soro fetal bovino depletado do complexo ferro-transferrina e suplementado com outras fontes do metal. O acréscimo de 8 μM de ferro associado à lactoferrina, hemoglobina ou transferrina possibilitaram crescimento normal das formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*. Por outro lado, o ferro associado à ferritina não permitiu o crescimento dos parasitos *in vitro* (Wilson *et al.*, 1994). O mesmo estudo demonstrou que a aquisição de ferro está relacionada à fase de crescimento dos parasitos sendo que maiores quantidades do metal são obtidas a partir de transferrina e lactoferrina durante a fase logarítmica (Wilson *et al.*, 1994).

Estudos mais recentes demonstraram que promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* expressam duas proteínas de membrana que são importantes para a aquisição do ferro: a enzima redutase férrica LFR1 (*Leishmania* ferric reductase 1) que reduz o Fe^{+3} a Fe^{+2} e o transportador de ferro LIT1 (*Leishmania* iron transporter 1) que transfere o Fe^{+2} para o citosol do parasito (Huynh *et al.*, 2006; Flannery *et al.*, 2011) (Figura 5). A expressão da enzima LFR1 é necessária para a geração de promastigotas metacíclicos capazes de infectar o hospedeiro mamífero (Flannery *et al.*, 2011). O transportador LIT1 é essencial para a replicação de promastigotas em meio depletado de ferro, para a proliferação de amastigotas nos macrófagos e para o desenvolvimento de lesões cutâneas em camundongos (Huynh *et al.*, 2006; Mitra *et al.*, 2013). A disponibilidade de ferro regula a expressão de LFR1 e LIT1: as proteínas são pouco expressas quando há grande abundância de ferro, mas sua expressão sofre um drástico aumento quando há pouca oferta do metal (Mitra *et al.*, 2013; Mitra e Andrews, 2013). Promastigotas selvagens de *L. (L.) amazonensis* cultivados em meio depletado de ferro aumentam a expressão de LIT1 e, conseqüentemente, passam a captar mais ferro aumentando a concentração intracelular do metal (Mitra *et al.*, 2013). Nestas condições, os parasitos são estimulados a produzir a enzima ferro superóxido dismutase (FeSOD) que converte o O_2^- em H_2O_2 . Nos promastigotas selvagens, o H_2O_2 atua como um sinalizador que induz sua diferenciação em amastigotas garantindo sua sobrevivência. Por outro lado, promastigotas LIT1 nulos ($\Delta lit1$) apresentam um acúmulo de O_2^- além de disfunção mitocondrial uma vez que a privação de ferro intracelular acarreta na perda dos

grupamentos Fe-S essenciais para o transporte de elétrons na mitocôndria (Mitra *et al.*, 2013). Sendo assim, na ausência de H₂O₂ os promastigotas $\Delta lit1$ não se diferenciam em amastigotas sendo levados à morte (Mitra *et al.*, 2013). A mitocôndria é um dos principais sítios de produção de H₂O₂, pois a organela abriga uma das isoformas da enzima ferro superóxido dismutase, denominada FeSOD A. Deste modo, a importação de ferro para a mitocôndria também é importante para a diferenciação dos promastigotas em amastigotas em ambientes depletados do metal. Um estudo recente revelou que o transportador LMIT1, (*Leishmania* Mitochondrial Iron Transporter 1) uma proteína transmembrana similar à mitoferrina dos mamíferos, é responsável pela internalização do ferro pela mitocôndria dos parasitos (Mitra *et al.*, 2016) (Figura 5). Promastigotas mutantes contendo apenas um alelo de LMIT1 ($\Delta lmit1$) apresentaram menor densidade celular durante sua curva de crescimento e também foram mais sensíveis às ROS. Os promastigotas $\Delta lmit1$ diferenciaram-se em amastigotas, porém estas formas evolutivas não foram capazes de se replicar nos fagolisossomos dos macrófagos ou causar lesões cutâneas em camundongos demonstrando a importância do transportador para a infectividade dos parasitos (Mitra *et al.*, 2016).

Os protozoários do gênero *Leishmania* também podem adquirir ferro a partir do heme e da hemoglobina (Figura 5). Promastigotas e amastigotas não possuem uma via completa para síntese do grupo heme (Koreny *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2011). Por esta razão, para garantir a sobrevivência dos parasitos cultivados *in vitro*, é necessário acrescentar hemina ou protoporfirina IX ao meio de cultura enquanto na natureza os protozoários adquirem heme exclusivamente a partir do hospedeiro (Chang *et al.*, 1985; Koreny *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2011). Atualmente, considera-se que *Leishmania* pode adquirir heme por endocitose de hemoglobina ou por transporte através da membrana celular do parasito (Figura 5). As formas promastigotas de *L. (L.) donovani* adquirem hemoglobina a partir de um receptor de 46 kDa localizado na bolsa flagelar. Ensaio utilizando meio de cultura enriquecido com hemoglobina I¹²⁵ demonstraram que os parasitos são capazes de internalizar e degradar a proteína (Sengupta *et al.*, 1999). A hemoglobina também constitui uma fonte de ferro para as formas amastigotas de *Leishmania*. O acréscimo de hemina ou

hemoglobina ao meio de cultura foi capaz de reverter o efeito inibitório do quelante de ferro DFO sobre o crescimento de amastigotas axênicos de *L. (L.) infantum* (Carvalho *et al.*, 2009). Anticorpos gerados contra o receptor de hemoglobina de *L. (L.) donovani* bloquearam a captação de hemoglobina pelas amastigotas axênicas de *L. (L.) infantum*, indicando que um receptor semelhante participa da aquisição de hemoglobina nesta espécie (Carvalho *et al.*, 2009). A ligação entre o receptor e a hemoglobina é específica uma vez que outras proteínas tais como hemina, globina, transferrina e mioglobina não afetaram sua aquisição pelos parasitos (Sengputa *et al.*, 1999). Ensaio de cinética enzimática utilizando frações purificadas do receptor de hemoglobina de *L. (L.) donovani* comprovaram sua especificidade. Adicionalmente, a clonagem e a análise da sequência do gene do receptor da hemoglobina indicaram que o mesmo é uma hexokinase, enzima que participa da via glicolítica e atua internalizando a hemoglobina por endocitose (Krishnamuthy *et al.*, 2005). Após a ligação com o receptor, a hemoglobina é endocitada em vesículas de clatrina e transportada através da via endocítica até os lisossomos do parasito em um processo mediado pelas GTPases Rab5 e Rab7 (Singh *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2008; Agarwal *et al.*, 2013). No interior dos lisossomos, a hemoglobina é degradada e libera o heme que é translocado para o citosol através da proteína LABCG5 que atua como um transportador dependente de ATP (Campos-Salinas *et al.*, 2011) (Figura 5).

Como mencionado anteriormente, promastigotas e amastigotas podem adquirir heme por transporte direto através da membrana celular do parasito (Figura 5). A existência de um transportador ou receptor de heme em *Leishmania* começou a ser especulada após a demonstração de uma ligação de alta afinidade desta molécula à superfície celular de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* (Carvalho *et al.*, 2009; Galbraith *et al.*, 1988). A identificação do transportador LABCG5 em *L. (L.) donovani* também foi uma evidência para a presença de um transportador de heme na membrana celular dos parasitos (Campos-Salinas *et al.*, 2011). Dois transportadores de heme já haviam sido identificados no nematóide *Caenorhabditis elegans*: HRG-1, que transporta o heme do lisossomo para o citosol e HRG-4 que se localiza na membrana celular captando heme do meio externo (Rajagopal *et al.*, 2008). Uma busca

por proteínas similares ao HRG-4 no genoma de *Leishmania* revelou que *L. (L.) amazonensis* possui uma pequena proteína de 20 kDa que possui quatro domínios transmembrana e 45% de similaridade com o transportador HRG-4 (Huynh *et al.*, 2012). Esta proteína, denominada LHR1 (*Leishmania* Heme Response 1) está presente na membrana celular e nos lisossomos de *L. (L.) amazonensis* controlando a captação de heme pelos parasitos (Huynh *et al.*, 2012) (Figura 5). O transportador LHR1 é essencial para a infectividade de *L.(L.) amazonensis* (Miguel *et al.*, 2013). Promastigotas mutantes contendo apenas uma cópia do LHR1 ($\Delta lhr1$) podem se diferenciar em amastigotas, mas não conseguem se replicar nos fagolisossomos dos macrófagos e, conseqüentemente, não desenvolvem lesões em camundongos (Miguel *et al.*, 2013). O crescimento dos amastigotas $\Delta lhr1$ foi restaurado em macrófagos que fagocitaram hemácias antes da infecção indicando que em um ambiente rico em heme os parasitos mutantes conseguem internalizá-lo por mecanismos de baixa afinidade (Miguel *et al.*, 2013). Durante infecções viscerais os amastigotas têm acesso facilitado ao heme porque se replicam em macrófagos localizados no fígado, baço e medula óssea onde há intensa fagocitose de hemácias senescentes. Deste modo, embora estudos adicionais sejam necessários, é possível que a aquisição do heme também seja um fator importante na patogênese da leishmaniose visceral (Miguel *et al.*, 2013). Mesmo após diversas tentativas não foi possível obter um mutante nulo para o LHR1, pois os parasitos não eram viáveis sugerindo a importância do transportador para a sobrevivência de *Leishmania*.

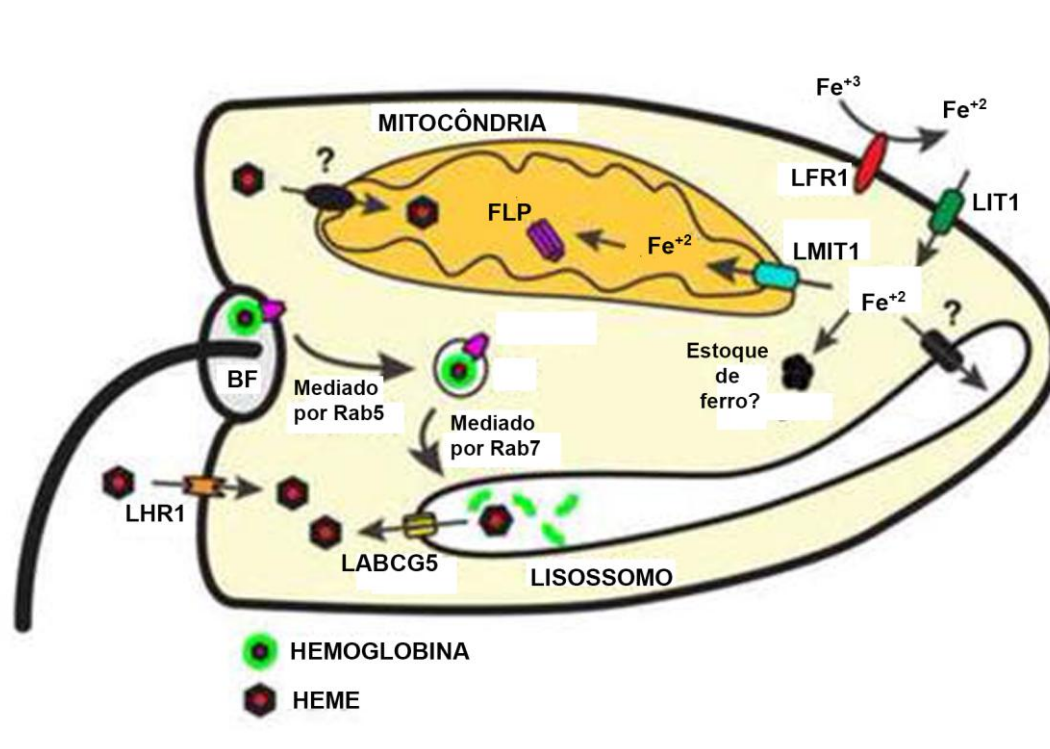


Figura 5. Representação esquemática das vias de aquisição de ferro em *Leishmania*. A enzima (LFR1) reduz o ferro de Fe^{+3} a Fe^{+2} e o transportador (LIT1) carrega o Fe^{+2} para o citosol. Ainda não forma identificados transportadores de ferro nos lisossomos de *Leishmania*. No entanto, o transportador LMIT1 transporta o Fe^{+2} para a mitocôndria onde o metal possivelmente é estocado associado a uma proteína frataxina like (FLP). Não existem proteínas ortólogas à ferritina em *Leishmania*. O ferro associado ao heme pode ser obtido através de duas formas distintas. A hemoglobina associada à hexokinase é transportada para os lisossomos e degradada liberando o heme. Este é então translocado para o citosol através do transportador LABC5. O heme também pode ser internalizado diretamente através do transportador LHR1. Imagem adaptada de Flannery *et al* (2013).

O ferro é essencial para a sobrevivência, crescimento e estabelecimento da infecção por *Leishmania*. Contudo, até o momento, existem poucos relatos sobre o papel do metal na biologia de *L. (V.) braziliensis*. Durante a presente tese foi avaliado o efeito do ferro sobre a proliferação, a ultraestrutura, a expressão proteica e a interação entre *L. (V.) braziliensis* e matrizes de colágeno sintéticas.

1.9. Matriz extracelular (MEC) e sua importância durante a infecção por *Leishmania*

A MEC é uma complexa mistura de carboidratos e proteínas responsável por diversas funções biológicas, tais como sinalização, migração celular e suporte mecânico para diferentes órgãos e tecidos (Pedersen e Swartz, 2005; Morwood e Nicholson, 2006). Esta estrutura também tem um papel fundamental na diferenciação, migração, expressão gênica e proliferação de distintos tipos celulares (Plant *et al.*, 2009; Rhee, 2009) bem como em diversos processos patogênicos (Bornstein *et al.*, 2002). Fazem parte dos componentes da matriz o colágeno, fibronectina, laminina, hialuronas, proteoglicanas, dentre outros (Pedersen e Swartz, 2005; Morwood e Nicholson, 2006). Durante o repasto sanguíneo do vetor, as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado devem ultrapassar uma série de obstáculos, incluindo os componentes da MEC, para estabelecer o processo de infecção. A migração dos parasitos bem como a infecção, inativação de macrófagos e multiplicação intracelular são fatores dependentes, dentre outros, dos componentes da MEC (McGwire *et al.*, 2003; Kulkarni *et al.*, 2008). A degradação de fibronectina e colágeno por metalopeptidases produzidas pelos parasitos podem interferir no processo de ativação de células da imunidade inata, principalmente macrófagos, dificultando a eliminação dos parasitos (Kulkarni *et al.*, 2008). Similar ao que ocorre em algumas células tumorais, a migração dos parasitos pela MEC e lâmina basal pode facilitar sua disseminação via circulação sanguínea ou linfática para áreas não contíguas do corpo (McGwire *et al.*, 2003). Com o intuito de estudar e entender os fenômenos biológicos desempenhados pela MEC, matrizes sintéticas têm sido utilizadas *in vitro* a fim de mimetizar o ambiente extracelular *in vivo*. Os géis polimerizados com colágeno, fibrina e fibronectina são os mais utilizados (Zaman *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2008; Rhee, 2009).

1.10. Peptidases de *Leishmania*

As peptidases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas sendo necessárias para a sobrevivência dos mais diversos organismos. Ademais, constituem um grupo de enzimas de grande importância na biologia, biotecnologia e pesquisa médica (Barrett *et al.*, 2004). As peptidases podem ser classificadas como exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases clivam as ligações peptídicas na região amino ou carboxi terminal da proteína. Estas enzimas podem clivar um único resíduo na região N terminal sendo denominadas aminopeptidases. Também podem hidrolisar dipeptídeos ou tripeptídeos sendo designadas como dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases. Enzimas que clivam na região C terminal, liberando um único aminoácido, ou um dipeptídeo, são classificadas como carboxipeptidases e peptidil-dipeptidases, respectivamente. Algumas exopeptidases são específicas para dipeptídeos (dipeptidases) e existem ainda as omega peptidases que clivam ligações isopeptídicas (Barrett *et al.*, 2004). As endopeptidases clivam ligações internas, sendo que a especificidade é determinada, principalmente, pelos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo que são os responsáveis pela catálise. Assim, as endopeptidases são classificadas em uma das seguintes classes: asparagina, aspártico, cisteína, ácido glutâmico, metalo, serina, treonina e peptidases desconhecidas (Rawlings *et al.*, 2012). As peptidases atuam sobre diversos substratos proteicos *in vitro* incluindo gelatina, caseína, albumina, hemoglobina e fibrinogênio (Bouvier *et al.*, 1990). Eletroforese uni e bidimensional em géis de poliacrilamida copolimerizados com distintos substratos tem permitido a visualização e a caracterização de peptidases ativas em distintos protozoários parasitos incluindo *Leishmania* spp. (Cuervo *et al.*, 2006; Reyes-Uribe *et al.*, 2012). Cisteína-peptidases e metalopeptidases são importantes fatores de virulência nas diversas espécies de *Leishmania* contribuindo para o sucesso da infecção no hospedeiro mamífero. As cisteína-peptidases de *Leishmania* são particularmente expressas nos amastigotas sendo armazenadas no interior de lisossomos e megassomos. Estas peptidases estão envolvidas com a degradação do complexo de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II) dos macrófagos (Mottram *et al.*, 1998). Elas também modulam a produção de citocinas estimulando a

síntese de IL-4. Esta última estimula o desenvolvimento de uma resposta anti-inflamatória (Th2) que favorece o crescimento dos amastigotas (Mottram *et al.*, 1998). A GP63 é uma metalopeptidase zinco-dependente que representa cerca de 1% das proteínas totais do parasito e está presente majoritariamente em promastigotas sendo também expressa por amastigotas (Yao *et al.*, 2003). A migração das formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* através da matriz extracelular é aumentada durante a expressão ativa de metalopeptidases de superfície tais como a GP63, que é capaz de degradar colágeno e fibronectina (McGwire *et al.*, 2003). A GP63 também atua realizando a clivagem do componente C3b do sistema complemento em C3bi, facilitando a fixação dos parasitos aos macrófagos ao mesmo tempo em que inibe a proliferação das células natural killer (NK) (Brittingham *et al.*, 1995; Lieke *et al.*, 2008).

A degradação dos componentes da MEC é essencial para o estabelecimento da infecção por *Leishmania*. Alguns fatores podem contribuir para o sucesso da invasão da MEC tais como a secreção de proteínas e peptidases pelos parasitos e a tensão mecânica exercida pelos mesmos durante a migração. Na presente tese foram avaliadas (i) a ultraestrutura da interação entre os parasitos e as matrizes colágeno sintéticas e (ii) as proteínas e peptidases secretadas em meio de cultura e durante a interação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar o efeito da depleção de ferro sobre o crescimento celular, a ultraestrutura, a expressão proteica e a interação de *L. (V.) braziliensis* com matrizes de colágeno sintéticas.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o efeito da depleção de ferro sobre o crescimento celular e a viabilidade das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*;
- Analisar as alterações ultraestruturais sofridas pelos promastigotas de *L. (V.) braziliensis* cultivados em meio depletado de ferro;
- Avaliar o efeito da depleção de ferro sobre a expressão gênica dos complexos enzimáticos mitocondriais e a atividade mitocondrial de *L. (V.) braziliensis*;
- Avaliar o efeito da depleção de ferro sobre as concentrações intracelulares e extracelulares do metal e a expressão gênica dos transportadores de ferro e heme em *L. (V.) braziliensis*;
- Identificar as proteínas diferencialmente expressas em *L. (V.) braziliensis* cultivadas em meio depletado de ferro;
- Analisar a ultraestrutura da interação entre matrizes sintéticas de colágeno e *L. (V.) braziliensis*;
- Identificar as proteínas e peptidases secretadas durante a interação entre matrizes sintéticas de colágeno e *L. (V.) braziliensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Parasitos

O isolado de *L. (V.) braziliensis* utilizado neste estudo (IOC-L 2483) está depositado na Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) (MHOM/BR/2000/LTCP 13396). Este isolado é proveniente de um paciente que apresentou múltiplas lesões cutâneas disseminadas e comprometimento mucoso reproduzindo o mesmo fenótipo metastático em modelo primata não humano (Souza-Lemos *et al.*, 2011). Ao longo do estudo os estoques criopreservados em solução de glicerol 8% foram descongelados e os promastigotas foram cultivados em meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino a 25°C. Antes da realização dos ensaios subsequentes, o isolado foi caracterizado como *L. (V.) braziliensis* por eletroforese isoenzimática (Cupolillo *et al.*, 1994).

3.2. Quelante de ferro

O quelante de ferro 2,2-dipyridyl (DIP) é um composto orgânico, sintético e lipofílico que se associa ao ferro extracelular e intracelular, ligando-se preferencialmente ao íon Fe^{+2} (Figura 6-A e B). As soluções estoque do DIP (Sigma Aldrich) foram preparadas a 640 mM em etanol absoluto.



Figura 6. Representação do quelante de ferro 2,2-dipyridyl (DIP) (A): Estrutura química; (B): Três moléculas de 2,2-dipyridyl associadas ao íon Fe^{+2} .

3.3. Curva de crescimento

Para verificar a influência da depleção de ferro sobre a multiplicação de *L. (V.) braziliensis in vitro*, 1×10^6 promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram inoculados em garrafas de cultura contendo 10 ml de meio Schneider fresco suplementado com soro fetal bovino na ausência e na presença do quelante DIP. A depleção de ferro foi obtida pela adição do quelante ao meio de cultura nas concentrações de 25, 50, 100, 140 e 180 μM . A densidade celular foi determinada diariamente durante oito dias por contagem das formas promastigotas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi estimada utilizando o teste de exclusão por coloração com Trypan Blue.

3.4. Ensaio de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade do quelante DIP sobre as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, 2×10^6 parasitos em fase logarítmica de crescimento foram ressuspensos em 1 ml de meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino. O volume de 100 μl desta suspensão foi adicionado ao volume de 80 μl da solução de DIP, de modo a se obter como concentrações finais 25, 50, 100, 140 e 180 μM . Os parasitos (2×10^5 /poço) foram incubados em placas de 96 poços a 25 °C por 16 ou 40 h. Após este período, 20 μl do reagente fluorogênico Alamar Blue® (Invitrogen) foram adicionados a cada poço. A resazurina é o composto ativo do reagente Alamar Blue®, possui coloração azul, não emite fluorescência e é capaz de difundir-se através da membrana celular. Após penetrar a célula, a resazurina é reduzida à resorufina, um composto de coloração vermelha capaz de emitir fluorescência. As células viáveis realizam continuamente a conversão de resazurina em resorufina, modificando a coloração do meio e aumentando a fluorescência emitida. Após a adição do Alamar Blue®, os parasitos foram incubados por mais 8 h e, posteriormente, as fluorescências emitidas foram detectadas a 570 nm (pico de excitação) e 585 nm (pico de emissão). Os resultados foram analisados a partir da construção de gráficos exibindo a intensidade da fluorescência emitida versus a concentração de DIP. As concentrações

inibitórias responsáveis por 50% de redução da viabilidade celular (IC_{50}) foram determinadas após 24 e 48 h.

3.5. Microscopia eletrônica de transmissão

As formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (5×10^6 células/ml) foram tratadas com 100 μ M de DIP por 24 h em meio Schneider a 25 °C. Os parasitos foram fixados com 2,5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 40 min. Após esta etapa, os parasitos foram pós-fixados em solução de 1% OsO₄, 0,8% ferrocianeto de potássio e 2,5 mM CaCl₂ no mesmo tampão por 20 min a 25 °C. As células foram desidratadas em acetona e emblocadas em resina PolyBed 812. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo sendo posteriormente examinados com um microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011 (Tóquio, Japão).

3.6. Análise do potencial de membrana mitocondrial e da integridade da membrana celular por citometria de fluxo utilizando os marcadores TMRE e PI

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e a integridade da membrana plasmática foram determinados após 24 e 48 h de cultivo na ausência e na presença de 25, 50 e 100 μ M do quelante DIP. A fim de determinar o $\Delta\psi_m$ os promastigotas ($2,5 \times 10^6$) foram incubados com 50 nM de tetrametilrodamina (TMRE) (Molecular Probes, Carlsbad, USA) por 30 min. A TMRE é um cátion lipofílico que se difunde através da membrana celular e das membranas mitocondriais acumulando-se na matriz das mitocôndrias ativas. Este acúmulo se deve tanto à solubilidade do composto quanto à diferença de cargas entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas. À medida que a TMRE se acumula na matriz mitocondrial, ocorre um aumento na emissão de fluorescência. Neste ensaio, as alterações na fluorescência da TMRE foram quantificadas utilizando um índice de variação (IV) obtido a partir da equação $(MT - MC) / MC$, onde MT representa a mediana da fluorescência dos parasitos tratados e MC é a mediana da fluorescência do grupo controle. Valores negativos de IV correspondem à redução do potencial de membrana mitocondrial. Como controle negativo, acrescentou-se 10 μ M de carbonil

cianeto 4-(trifluoro-metoxi) fenildrazona (FCCP) (Sigma-Aldrich Chemical Co) às células incubadas com TMRE. O FCCP é um ionóforo que carrega íons H⁺ através das membranas biológicas. Este composto altera o gradiente de prótons da membrana mitocondrial interna dissipando o $\Delta\psi_m$ e interrompendo a transferência de elétrons e a síntese de ATP. Sendo assim, nos parasitos incubados com FCCP, houve diminuição da fluorescência da TMRE.

A fim de avaliar a integridade da membrana plasmática, os parasitos foram marcados com 30 µg/ml de iodeto de propídio (PI) e incubados por 30 min. O PI é um agente intercalante fluorescente que interage com o DNA interpondo-se entre os pares de bases. À medida que o PI é acoplado aos ácidos nucleicos, ocorre um aumento na emissão de fluorescência. Como o PI não se difunde através da membrana celular íntegra, este reagente pode ser utilizado para diferenciar células viáveis ou apoptóticas daquelas em necrose. Como controle positivo, foram utilizados parasitos ressuspensos em 0,1% de saponina. O detergente promoveu a ruptura da membrana celular possibilitando a marcação pelo PI. No presente experimento, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickison, CA, EUA) equipado com o software Cell Quest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, LA Jolla, EUA), sendo que 10.000 eventos foram adquiridos na região previamente estabelecida como a dos parasitos.

3.7. Análise de fragmentação do DNA nuclear por microscopia de fluorescência utilizando o marcador TUNEL

Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* cultivados na ausência e na presença de 100 µM de DIP por 24 e 48 h foram marcados com TUNEL (Sigma-Aldrich Chemical Co) para a detecção de fragmentos de DNA nuclear *in situ*. A técnica do TUNEL consiste na adição de nucleotídeos marcados à extremidade 3' OH dos fragmentos de DNA pela ação da enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyltransferase), uma DNA polimerase exógena. Com esta técnica células em processo de morte são marcadas pelo TUNEL e emitem maior fluorescência quando analisadas por citometria de fluxo do que as células viáveis. Para a realização desse experimento os promastigotas (10^6) foram centrifugados (3000x g, 10 min, 4°C), ressuspensos em PBS e espalhados em

lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina. Após a secagem das lâminas os promastigotas foram fixados em paraformaldeído 4% por 10 min e lavados com PBS. Subsequentemente, os parasitos foram bloqueados com 0,03% de H₂O₂ em metanol, lavados com PBS e permeabilizados com 0,1% de Triton X-100 em 0,1% de citrato de sódio por 2 min a 4°C. Os controles positivos foram tratados com 12 µL de DNase por 15 min e bloqueados com 25 mM de EDTA por 10 min. Então, todas as amostras foram incubadas com a mistura de reação do TUNEL por 60 min a 37 °C. Depois, foram lavadas e incubadas com 300 µM de DAPI (Invitrogen) por 2 min. Finalmente, as amostras foram lavadas com PBS e as lâminas foram montadas em n-propil-galato. As imagens foram adquiridas por microscopia de contraste de fases e fluorescência.

3.8. Eletroforese bidimensional e espectrometria de massas de *L. (V.) braziliensis* cultivada na ausência e na presença de 100 µM de DIP

3.8.1. Extração de proteínas

As formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (1×10^9) foram tratadas com 100 µM de DIP por 24 h em meio Schneider a 25 °C. Posteriormente, foram centrifugadas a 4000 RPM por 10 min a 4 °C, lavadas três vezes em PBS pH 7.2 e lisadas (por 15 ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido e ultrasonificação) em tampão PBS hipotônico acrescido de um coquetel de inibidores de proteases. Conforme descrito por Cuervo *et al* (2007), o lisado foi centrifugado a 14000 RPM por 30 min a 4°C para remoção de material insolúvel, o sobrenadante foi precipitado com TCA (10%) e lavado com acetona nas mesmas condições. Finalmente, as proteínas foram ressuspensas em tampão para focalização isoeletrica, IEF (9M uréia, 4% CHAPS, 65 mM dithiothreitol (DTT) e 1% anfólitos pH 3-10) por uma hora a temperatura ambiente. As proteínas foram quantificadas usando “kit” comercial compatível com os componentes do tampão IEF (2-D Quant Kit, Amersham) e seguindo os protocolos do fabricante. As proteínas foram aliqotadas e armazenadas a -80°C.

3.8.2. Eletroforese bidimensional

Para a primeira dimensão, 500 µg de proteína foram diluídos em 350 µl de tampão de reidratação (9M uréia, 4% CHAPS, 40 mM DTT, 1.5% anfólitos pH 3-10, e 0,001 % de azul de bromofenol). Esta solução foi aplicada às fitas para focalização isoeétrica (18 cm pH 3-10 não linear; GE). A focalização foi realizada em um sistema Ettan IPGphor 3 (GE) a 20°C com uma corrente máxima de 50 µA/fita. Os parâmetros desta focalização foram: reidratação passiva por 12 h; passo 1 – gradiente de 1 a 250 V durante 30 min; passo 2 – gradiente de 250 V a 1000 V por 30 min; passo 3 – 1000 V constantes por 1 h; passo 4 – gradiente de 1000 V a 4000 V durante 45 min; passo 5 – 4000 V constantes por 1 h; passo 6 – 8000 V até completar 55000 Vh, para um total de aproximadamente 70000 Vh. Previamente à segunda dimensão, as proteínas foram reduzidas (10 mg/ml DTT) e alquiladas (25 mg/ml iodoacetamida) em tampão de equilíbrio (6M uréia, 2% SDS, 300 mM Tris-Cl pH 8.8, 20% Glicerol). As fitas equilibradas foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida (10%) mais SDS, usando o sistema vertical (Biorad) com tampão Tris/glicina/SDS. As proteínas foram separadas a 40mA/gel a 15°C até o marcador alcançar o final do gel.

3.8.3. Visualização das proteínas e análise da imagem dos géis bidimensionais

Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 coloidal. Após a coloração, os géis foram documentados usando um densitômetro GS800 Calibrated Densitometer (Biorad) e a análise de imagem foi realizada usando o programa PDQuest (Biorad). A comparação de três géis bidimensionais obtidos a partir de três replicatas biológicas produz a informação sobre o efeito da depleção de ferro em *L. (V.) braziliensis*.

3.8.4. Digestão de proteínas, extração de peptídeos e espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF)

As peças de gel foram extraídas manualmente do gel. Posteriormente, foram lavadas com 50% v/v acetonitrila em bicarbonato de amônio 25 mM, desidratadas com acetonitrila 100% e secas por centrifugação a vácuo. Em

seguida, as peças de gel foram reidratadas com 15 µl de bicarbonato de amônio 50 mM contendo 200 ng de tripsina (Promega). Após 15 min, foram adicionados 20 µl de uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM para manter as peças úmidas durante a clivagem triptica (37°C, overnight). Para extrair os peptídeos, foram adicionados 20 µl de TFA 0.5% v/v em acetonitrila 50% v/v e as amostras foram ultrasonificadas por 30 min. O líquido separado contendo os peptídeos foi seco ao vácuo até um volume aproximado de 10 µl. Antes da análise por espectrometria de massas, os peptídeos foram dessalinizados usando uma mini-coluna de fase reversa (ZipTip C18, Millipore, Bedford, MA, EUA) seguindo os protocolos do fabricante. Os peptídeos foram eluídos dos ZipTips usando 3.0 µl de TFA 0.1% v/v em 50% v/v acetonitrila e posteriormente co-cristalizados com matriz (alfa-cyano-4-hydroxycinnamic acid, 7 mg/mL) diretamente sobre uma placa de aço inox usando uma proporção 1:1 de matriz e amostra. Os espectros de massa (MS) foram adquiridos em um espectrômetro 4700 MALDI-TOF-TOF (Amersham Biosciences), operando no modo refletor com uma voltagem acelerada de 20 kV. Os espectros de massa em tandem (MS/MS) dos peptídeos foram adquiridos para os cinco peptídeos mais intensos do espectro de massa inicial usando um modo de aquisição refletor. A busca foi feita de forma combinada, isto é, usando os dados de MS e MS/MS na base de dados não redundante do National Center for Biotechnology (NCBI) empregando o programa Mascot MS/MS ion search (Matrix Science, Oxford, UK, www.matrixscience.com/search_form_select.html). Os parâmetros de busca no servidor Mascot foram os seguintes: ausência de restrições taxonômicas; permissão de peptídeos tripticos com apenas uma clivagem errônea; carbamidometilação dos resíduos de cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável, 100 PPM de tolerância para as massas no modo MS e 0,8 Da de tolerância para seus fragmentos correspondentes no modo MS/MS.

3.9. Análise da expressão gênica por PCR quantitativo (qPCR)

O qPCR foi utilizado em dois momentos durante a tese: (i) para testar se as proteínas diferencialmente expressas por 2DE e espectrometria de massas também seriam no nível de RNAm e (ii) para avaliar a expressão de genes alvos relacionados com a captação do ferro (*LIT1* e *LHR1*), a função

mitocondrial (*SD*, *CitB*, *CitC* e *ATPs*) ou com a detoxificação de ROS (*FeSOD*). No primeiro momento foi feita uma comparação entre a expressão dos genes *EIF5A*, *CAL*, *UCEE2*, *UCELP*, *RP18* e *60S* em promastigotas cultivados por 24 h na ausência e na presença de 100 μ M do quelante DIP. No segundo momento, a expressão gênica foi avaliada em promastigotas cultivados por 24 h e 48h nas mesmas condições. A extração do RNA total dos promastigotas foi feita com o reagente Trizol (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante. A concentração e a pureza do RNA foram verificadas em Nanodrop (Thermo Scientific) através da relação 260/280/230 nm. Após a quantificação, 2 μ g do RNA foram tratados com DNase I (Sigma-Aldrich) para evitar a contaminação com DNA genômico. Posteriormente, a síntese do cDNA foi realizada utilizando o sistema de transcrição reversa (Promega). As reações de PCR em tempo real para quantificação da expressão gênica (qPCR) foram feitas em duplicata utilizando o Master mix PCR SYBR Green (Applied Biosystems) em uma máquina Step One (Applied Biosystems) para qPCR. As condições da ciclagem da PCR foram as seguintes: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 10 s, 56 °C por 20 s e 72 °C por 20 s. Após a amplificação do cDNA foram realizadas curvas de melting para monitorar a especificidade dos primers. Os primers para amplificar as sequências dos genes endógenos e dos genes alvos foram desenhados com base nas sequências do genoma de *L.(V.) braziliensis*. Actina e 40S ribossomal foram utilizados como genes endógenos. A quantificação relativa do nível de expressão dos genes alvos foi feita pelo método do $\Delta\Delta C_t$ e os dados demonstrados como razões normalizadas entre a expressão dos genes alvos e os genes endógenos. A eficiência dos primers foi calculada a partir de uma regressão linear baseada nos logaritmos da diluição do cDNA e inferida através do coeficiente de determinação e da declividade da reta. Os primers de qPCR utilizados durante a tese estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Primers de qPCR utilizados durante a tese. Na tabela estão demonstrados o código de acesso dos genes, seus nomes completos, as siglas dos genes e as sequências dos primers (forward e reverse) utilizados. Também estão representados os valores de declividade da reta (DR), coeficiente de determinação (R^2) e eficiência (E).

Código de Acesso	Gene	Sigla do gene	Primer forward Primer reverse	DR 24 h	DR 48 h	E (%) 24 h	E (%) 48h	R^2 24 h	R^2 48 h
LBRM_25_0580	Eukaryotic initiation factor 5a	EIF 5a	GATACGTGTGCATCAACGGC TGAAGATGTCGGTCGCAACA	-3,1192	-	109	-	0,9981	-
LBRM_09_0980	Putative calmodulin	CAL	CTCTTTGACAAGGACGGCGA TCCTGGTCCACCTCGTTGAT	-3,4195	-	96	-	0,9946	-
LBRM_34_1220	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 partial mRNA	UCEE2	TACCCGTTCAAGCCACCAAA GCACACGGAGAGTAACACCT	-3,2645	-	102	-	0,9983	-
LBRM_13_1440	Ubiquitin-conjugating enzyme-like protein	UCELP	AAAACGTCTCCGTGGGTCTG GCGACAGGATGCGATACTCA	-3,7346	-	85,25	-	0,9902	-
LBRM_15_0310	Putative ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor	Rp18	AGCCAGCTTATCTGCACCG GCCGAACAGGTCGTACTIONTCT	-3,5089	-	92,74	-	0,9827	-
LBRM_30_3760	Putative 60S acidic ribosomal protein P2 (LIP2)	60S	GGTGTGGCCATTGAGTTGTCC AGCTCATCGAAGCTCTTGCC	-3,244	-	103	-	0,9997	-
LBRM_24_1690	Putative succinate dehydrogenase flavoprotein	SD	GATGAAACACACACTCGCCTA TACTGTCCACCTCGTTTGTCA	-3,7235	-3,7969	85,19	83,38	0,9909	0,9987
EU499930.1	Cytochrome b (Cytb) gene	CitB	GCCATGTACAATGATGTCGTA ATCAAACACCAATAACTGGCAC	-3,5322	-3,5783	91,91	90,31	0,9948	0,9988
LBRM_12_0670	Cytochrome c oxidase subunit IV	CitC	ACTACAAGTTCAACGGCGAG AGTTGGTCTCCTCCTCTGTC	-3,5823	-3,3795	90,17	97,65	0,9949	0,9916

<i>LBRM_33_0830</i>	ATP synthase F1 subunit gamma protein	<i>ATPs</i>	CATCCCCGCCTATGATAAGT CGAAGAGATACCGACTCCTT	-3,5772	-3,7626	90,34	84,4	0,992	0,9958
<i>LBRM_31_3500</i>	Iron/zinc transporter protein- like protein	<i>LIT1</i>	GCCACCAGCACCTGTCAGTT GCGTCACACCGAACTCCATACA	-3,7397	-3,821	85,09	82,68	0,9994	0,997
<i>LBRM_24_2310</i>	Hypothetical predicted multi- pass transmembrane protein	<i>LHR1</i>	ACCGCCTGTACCAGATTTTC AAAGTACGACTTCGCTGTCC	-3,5518	-3,5663	91,22	90,72	0,9915	0,9959
<i>LBRM_08_0330</i>	Iron superoxide dismutase	<i>FeSOD</i>	ACGCTTGGCACAGGCTACGA TGGTTGAAGAGGACGGTGTTCG	-3,5684	-3,5395	90,65	91,65	0,9973	0,999
<i>LBRM_35_3540</i>	Actin	<i>ACT</i>	GGCGAACGAGGAGTCATTTG ATCAGCGACGGCTTGAACAG	-3,2092	-3,2877	104	101	0,9976	0,9936
<i>LBRM_24_2160</i>	Putative 40S ribosomal protein S8	<i>40S</i>	AGACGCTGGTGAAGAACTGC AAGTCGATGCCGTAATGCTT	-3,3051	-3,4895	100	93,4	0,9903	0,9974

Legenda: DR (Declividade da reta), E % (Eficiência expressa em percentual), R² (coeficiente de determinação)

3.10. Quantificação do ferro intracelular e extracelular pelo método da ferrozina

A concentração de ferro foi determinada após 2, 24 e 48 h de cultivo em meio Schneider suplementado com soro fetal bovino na ausência e na presença de 50 e 100 μM do quelante DIP. Para medir a concentração de ferro intracelular, os parasitos (1×10^8) foram centrifugados, lavados em PBS e lisados em 100 μL de NaOH 50 mM. Para determinar a concentração de ferro extracelular, o sobrenadante (meio de cultura) foi coletado após os tempos de incubação citados acima. Foram adicionados (aos parasitos lisados e ao meio de cultura) 100 μL de HCl 10 mM e, posteriormente, mais 100 μL da solução de liberação do ferro preparada através da mistura de volumes iguais de HCl 1,4M e KMnO_4 4,5%. As amostras foram então incubadas em estufa a 60°C por 2h. Em meio ácido o KMnO_4 atua como um agente oxidante forte, convertendo o íon Fe^{+2} das hemeproteínas em Fe^{+3} . Sob a forma de Fe^{+3} o ferro perde a afinidade pelas proteínas e fica livre para reagir com 30 μL da solução de detecção do ferro (ferrozina 6,5 mM, neocuproina 6,5 mM, acetato de amônio 2,5M e ácido ascórbico 1M dissolvidos em água) (Riemer *et al.*, 2004). O ácido ascórbico atua como agente redutor convertendo todo o ferro em Fe^{+2} que se liga a ferrozina formando um complexo que absorve luz no comprimento de onda de 550 nm (Riemer *et al.*, 2004). A neocuproina é um quelante de cobre usado para impedir que o íon Cu^{+2} interfira na ligação do Fe^{+2} à ferrozina. Outros cátions divalentes (Mn^{+2} , Mg^{+2} , Ni^{+2} e Zn^{+2}) não afetam a quantificação do ferro por esse método (Riemer *et al.*, 2004). Após 30 min de incubação com a solução de detecção do ferro, 280 μL de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços e a absorvância foi detectada em 550 nm. A concentração de ferro nas amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de FeCl_3 (0 – 120 μM). A concentração de ferro intracelular foi normalizada pela concentração de proteína dos parasitos sendo expressa em ng (Fe) / mg proteína. As proteínas foram quantificadas pela leitura da absorvância em 660 nm após a adição do reagente Pierce 660 (Thermo Scientific). A concentração de ferro no meio Schneider está expressa em ng (Fe) / ml de meio de cultura.

3.11. Quantificação da concentração intracelular e extracelular do heme pelo método da piridina alcalina

Para determinar a concentração intracelular do heme em *Leishmania* é necessário lisar uma grande densidade de parasitos. Por esta razão, a concentração do heme intracelular foi determinada somente em promastigotas (2×10^9) cultivados na ausência e na presença de 100 μM do quelante DIP por 24 e 48 h. Por outro lado, a concentração do heme extracelular foi mensurada não somente após 24 e 48 h de cultivo, mas também no meio de cultura fresco antes de se adicionar os parasitos (0 h). Para determinar a concentração de heme intracelular, os promastigotas foram lavados em PBS e lisados com o auxílio de um sonificador de ponteira utilizando 70% da potência em pulsos de 5 s intercalados com 5 s de resfriamento. Os lisados foram diluídos duas vezes em solução contendo 20% NaOH 1 M e 48% piridina no interior de uma cubeta de quartzo de 1 mL. O meio de cultura também foi diluído duas vezes para a determinação da concentração de ferro extracelular. Em meio alcalino o nitrogênio que liga o íon Fe^{+2} à porfirina é substituído pela piridina e o hemocromo resultante é quantificado pela diferença entre os espectros do composto reduzido e do oxidado (Sinclair *et al.*, 2001). Durante o experimento o espectro de absorvância da amostra oxidada foi obtido entre os comprimentos de onda de 300 a 600 nm. Posteriormente, cristais de ditionito foram adicionados à amostra e o espectro de absorvância do hemocromo reduzido também foi adquirido. Para calcular a concentração do heme a absorvância obtida no pico do espectro (557 nm) foi subtraída daquela registrada no vale (541 nm) e multiplicada pelo coeficiente de extinção molar (20,7 nM).

3.12. Determinação do consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi determinado em um oxígrafo de alta resolução (Oroboros Co, Model 2K). Promastigotas (5×10^7) cultivados na ausência ou na presença de 100 μM do quelante DIP por 24 h foram ressuspensos em tampão de respiração (sucrose 125 mM, KCl 65 mM, Tris-HCl pH 7,2 10 mM, MgCl_2 1 mM e fosfato de potássio 2,5 mM) e adicionados às cubetas do oxígrafo. O consumo de oxigênio basal dos parasitos íntegros foi

registrado até que houvesse estabilidade no fluxo de oxigênio por célula. Posteriormente, a respiração mitocondrial foi inibida pela adição de 2 μM de antimicina A, inibidor do complexo III da cadeia de transporte de elétrons. A temperatura foi mantida em 26 °C durante todos os experimentos e o volume total da reação por cubeta foi de 1 mL.

3.13. Determinação da atividade do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons

A atividade enzimática do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons foi mensurada em um espectrofotômetro após 24 h de cultivo dos promastigotas na ausência e na presença de 100 μM do quelante DIP. A atividade do complexo IV também foi determinada em promastigotas que foram reinoculados em meio Schneider's fresco por 48 h após 24 h de tratamento com 100 μM do DIP. Os parasitos ($6,75 \times 10^7$) foram lisados com um sonicador de ponteira (Branson). O substrato da enzima citocromo C oxidase foi obtido pela adição de um agente redutor (ditionito de sódio) a 50 μM do citocromo C no estado oxidado. A atividade da enzima citocromo c oxidase (complexo IV) foi mensurada pela diferença entre as absorvâncias emitidas pelo citocromo oxidado (antes da adição do extrato de proteínas dos parasitos) e pelo citocromo reduzido (após a adição do extrato de proteínas dos parasitos). O cianeto de potássio (KCN), inibidor da atividade do complexo IV, foi adicionado para interromper a atividade da enzima citocromo C oxidase.

3.14. Determinação da expressão proteica de *L. (V.) braziliensis* cultivada na ausência e na presença de 100 μM de DIP através do método MED-FASP (Multi-Enzyme Digestion – Filter Aided Sample Preparation) e espectrometria de massas

3.14.1. O método MED-FASP

Os promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, (1×10^9) foram incubados por 24 h em meio Schneider com 20% de soro fetal bovino na ausência e na presença de 100 μM de 2,2-dipyridyl. As proteínas foram processadas de acordo com o método MED-FASP (Multi-Enzyme Digestion - Filter Aided Sample Preparation, (Wisniewsk *et al.*, 2009; Wisniewski & Mann, 2012) que

consiste em realizar o procedimento de lise com SDS, digestão sucessiva com duas enzimas proteolíticas e extração dos peptídeos em um “reator” (filtro Microcon-30kDa). Inicialmente, os promastigotas (1×10^9) foram lisados no tampão de lise (0.05 M Tris-HCl, pH 7.6, 2% (v/w) SDS, 0.05 M DTT) e a concentração de proteínas foi dosada por absorvância a 280 nm. Em seguida, 200 ug de proteína foram adicionados ao filtro Microcon de 30 kDa e lavados várias vezes com tampão 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5 contendo 8 M uréia. As proteínas foram alquiladas no mesmo tampão contendo 0.05 M iodoacetamida. Posteriormente, foram lavadas duas vezes com tampão de uréia para a remoção da iodoacetamida. Em seguida, o tampão de digestão (0.05 M Tris-HCl, pH 8.5) contendo a enzima lisil endopeptidase (LysC) (proporção em ug 1:100) foi adicionado e incubado a 37°C por 4 h. Após esse período, a enzima tripsina foi adicionada ao mesmo tampão de digestão na proporção de 1:100, sendo incubada a 37°C por 18 h. Os peptídeos foram coletados por centrifugação, dosados por absorvância a 280 nm e posteriormente concentrados e dessalinizados para análise por espectrometria de massas.

3.14.2. Espectrometria de massas

Os peptídeos foram submetidos à nanocromatografia (nano-LC) em fase-reversa usando uma coluna capilar C18 em um cromatógrafo UPLC acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução LTQ ou Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, USA). A cromatografia utilizou um gradiente de 3-4 h com a fase móvel A 0.1% (v/v) ácido fórmico e B 0.1% (v/v) ácido fórmico em ACN. Os peptídeos eluídos foram injetados no espectrômetro de massas (nano-LC-MS/MS) para análise. Os espectros de MS1 (m/z 300–1600) foram medidos com uma resolução mínima de 70.000 a m/z 400 e os 10 ou 12 íons mais intensos foram submetidos a fragmentação HCD com uma energia de colisão normalizada de 35.0 para obtenção dos espectros MS2. A comparação de cinco replicatas biológicas analisadas duas vezes por LC-MS/MS produz a informação sobre o efeito da depleção de ferro em *L. (V.) braziliensis*. A quantificação dos peptídeos e das proteínas foi feita por *label free* através da análise da intensidade de cada peptídeo no cromatograma iônico.

3.14.3. Identificação das proteínas

As proteínas foram identificadas usando protocolos descritos anteriormente por nosso grupo (González-Caballero *et al.*, 2014). Em resumo, distintos softwares (Mascot e/ou Comet e/ou MaxQuant e/ou Peaks) foram usados para identificar as proteínas contra um banco de dados contendo as sequências das proteínas de *Leishmania spp*, obtidas de UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e uma base de dados *decoy* (banco criado invertendo a sequência original das proteínas oriundas do UniProt). Esta base de dados foi complementada com contaminantes frequentemente observados (tripsina porcina, lisil endopeptidase de *Achromobacter lyticus*, e queratinas humanas) e suas sequências invertidas também. Os parâmetros de pesquisa foram os seguintes: uma tolerância no MS de 5 ppm, uma tolerância no MS/MS de 10 ppm, duas clivagens perdidas da tripsina, carbamidometilação de cisteína definida como uma modificação fixa e oxidação de metioninas e acetilação N-terminal definidas como modificações variáveis. Os FDRs (*False Discovery Rate*) foram calculados com base no número de vezes que o software identifica as proteínas na base de dados *decoy*.

3.15. Ensaio com matrizes de colágeno 3D

3.15.1. Obtenção da solução de colágeno tipo I

A solução estoque de colágeno tipo I (10 mg/ml, *Rattus norvegicus*) foi obtida a partir de fibras de colágeno extraídas das caudas de ratos e purificadas a partir de ultracentrifugação, diálise e liofilização. O uso dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal do Centro de Ciências e Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IBCCF 096/097).

3.15.2. Preparação da matriz de colágeno 3D e ensaio de invasão de *L. (V.) braziliensis* sobre a matriz polimerizada

A solução estoque de colágeno tipo I foi diluída cinco vezes em meio RPMI concentrado (5X) e a densidade de 3 mg/ml foi alcançada complementando o volume com RPMI 1X. O pH da solução de colágeno foi

neutralizado com NaOH 0,1M e a solução foi armazenada em estufa a 37° C por 1 h para a polimerização da matriz. Posteriormente, com o intuito de avaliar a capacidade de invasão de *L. (V.) braziliensis*, 1×10^6 promastigotas foram inoculados sobre a matriz 3D polimerizada. Os promastigotas, previamente lavados em meio PBS, foram inoculados sobre a matriz polimerizada em 1 mL de meio RPMI 1X na ausência de soro fetal bovino. O ensaio de invasão foi realizado por 6 h em estufa 25° C. Decorrido este tempo, as matrizes de colágeno foram processadas para análise por microscopia eletrônica de varredura e o sobrenadante foi coletado para a identificação de proteínas e proteases secretadas durante o ensaio.

3.15.3. Microscopia eletrônica de varredura

Após a realização do ensaio de invasão com 1×10^6 promastigotas, as matrizes de colágeno foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas por 1 h em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão de cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. Após a fixação, as matrizes de colágeno foram pós-fixadas por 30 min em solução contendo tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 1,25% e CaCl₂ 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M. As amostras foram então sequencialmente desidratadas em uma série de etanol (40-100%) e após o ponto crítico de CO₂, foram metalizadas com uma camada de ouro de 20 nm de espessura e observadas em microscópio eletrônico de varredura, modelo Zeiss EM 940.

3.15.4. Separação e digestão das proteínas secretadas durante o ensaio de invasão de *L. (V.) braziliensis* sobre a matriz polimerizada

Após 6 h de incubação sobre a matriz polimerizada, o meio RPMI contendo os produtos de secreção dos promastigotas foi coletado e centrifugado a 4000 RPM por 10min. Os sobrenadantes resultantes foram coletados e submetidos à nova centrifugação a 14000 RPM por 20 min. Finalmente, os sobrenadantes livres de células foram concentrados em colunas Amicon (Millipore) até alcançarem a concentração de 10 µg de proteína. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e coradas com Coomassie Blue G 250 sendo digeridas de acordo com protocolos previamente estabelecidos (Cuervo *et al.*, 2009). Resumidamente, o gel foi separado em 8 pedaços de

mesmo tamanho e cada pedaço foi descorado três vezes em 400 µL de 50% de acetonitrila/ 25mM NH₄HCO₃ pH 8,0 por 15 minutos. As proteínas foram reduzidas em 65 mM de DTT por 30 minutos à 56°C e então alquiladas com 200 mM de iodoacetamida à 25 °C no escuro por 30 minutos. Posteriormente, os pedaços de gel foram lavados com 100 mM NH₄HCO₃ por 10 minutos, e em seguida foi adicionada acetonitrila por 5 minutos. A tripsina (200 ng) foi adicionada e incubada overnight à 37 °C. Os peptídeos foram purificados e concentrados usando uma coluna empacotada in-house com resina POROS oligo R3 de fase reversa (Applied Biosystems). Os peptídeos foram finalmente eluídos com uma solução de ácido fórmico 0.1% / acetonitrila 50 %.

3.15.5. Separação e digestão das peptidases secretadas durante o ensaio de invasão de *L. (V.) braziliensis* sobre a matriz polimerizada

Após 6 h de incubação sobre a matriz polimerizada, o meio RPMI contendo os produtos de secreção dos promastigotas foi coletado e centrifugado a 4000 RPM por 10min. Os sobrenadantes resultantes foram coletados e submetidos à nova centrifugação a 14000 RPM por 20 min. Em seguida, foram diluídos em tampão de amostra (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol e 0,002% azul de bromofenol) e submetidos à separação por eletroforese, a 4 °C e 110 V constantes, em géis de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 10% copolimerizados com 0,1% de gelatina de porco (Lockwood *et al.*, 1987). Foram aplicados 5 µg de proteína por poço em cada gel. Após a eletroforese os géis foram lavados duas vezes por 30 min a 4° C em tampão de acetato de sódio 0,1 M, 2,5% Triton X-100, pH 5,5. Posteriormente, os géis foram incubados em tampão de reação acetato de sódio 0,1 M pH 5,5. As bandas de atividade proteolítica foram visualizadas após a coloração dos géis com Coomassie Blue R 250 [0,25% azul de Coomassie R-250, 40% metanol e 10% de ácido acético] e posterior descoloração com solução de ácido acético 10%. As imagens dos géis foram obtidas utilizando um densitômetro GS-800™ (Bio-Rad). As três bandas de atividade proteolítica visualizadas foram recortadas, descoradas e digeridas seguindo a mesma metodologia descrita acima para as bandas do gel de SDS-PAGE. Posteriormente, os peptídeos foram purificados e concentrados usando uma coluna empacotada in-house com resina POROS oligo R3 de fase reversa

(Applied Biosystems). Os peptídeos foram finalmente eluídos com uma solução de ácido fórmico 0.1% / acetronitrila 50 %.

3.15.6. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi realizada utilizando um cromatógrafo UPLC acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, USA) seguindo a metodologia descrita anteriormente na presente tese.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do quelante de ferro DIP sobre o crescimento celular e a ultraestrutura mitocondrial de *L. (V.) braziliensis*

Os experimentos descritos no primeiro bloco da seção de resultados desta tese encontram-se publicados em Mesquita-Rodrigues *et al* (2013) (Anexo 8.1). O artigo descreve pela primeira vez o efeito da depleção de ferro sobre promastigotas de *L. (V.) braziliensis* utilizando o quelante DIP para restringir o acesso dos parasitos ao metal. Os principais resultados deste trabalho demonstraram que a depleção de ferro interrompe o crescimento celular e afeta a ultraestrutura da mitocôndria de *L. (V.) braziliensis*.

4.1.1. Efeito da depleção de ferro sobre a curva de crescimento dos isolados de *L. (V.) braziliensis in vitro*

A determinação da curva de crescimento da cepa de *L.(V.) braziliensis* utilizada nesse estudo foi o primeiro interesse da tese devido à importância de se avaliar o efeito do quelante de ferro DIP sobre a proliferação dos parasitos. Durante o experimento, 1×10^5 células/mL foram inoculadas em meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino na ausência ou na presença de distintas concentrações do DIP (25, 50, 100, 140 e 180 μ M). A densidade celular dos parasitos foi determinada diariamente durante oito dias por contagem dos promastigotas viáveis em câmara de Neubauer. Os resultados demonstraram que a curva de crescimento da cepa IOC L 2483 de *L. (V.) braziliensis* atingiu a fase logarítmica tardia de crescimento após seis dias de cultivo. O perfil da curva de crescimento foi semelhante ao observado por Cuervo (2007). A curva de crescimento de *L. (V.) braziliensis* foi alterada tanto pela concentração de DIP quanto pelo tempo de exposição ao quelante. Os promastigotas cultivados na presença de 25 μ M do quelante apresentaram uma curva de crescimento similar à dos parasitos cultivados na condição controle, porém tendo a densidade celular diminuída em cerca de 50 % do segundo ao oitavo dia de cultivo (Figura 7). Na presença de 50 μ M do quelante os promastigotas mantiveram-se vivos em cultura por sete dias, porém não houve aumento na densidade celular (Figura 7). Os promastigotas demonstraram ser susceptíveis às concentrações mais altas de DIP, observando-se a morte de

100% dos parasitos no quarto dia em cultura quando tratados com 100, 140 e 180 μM (Figura 7).

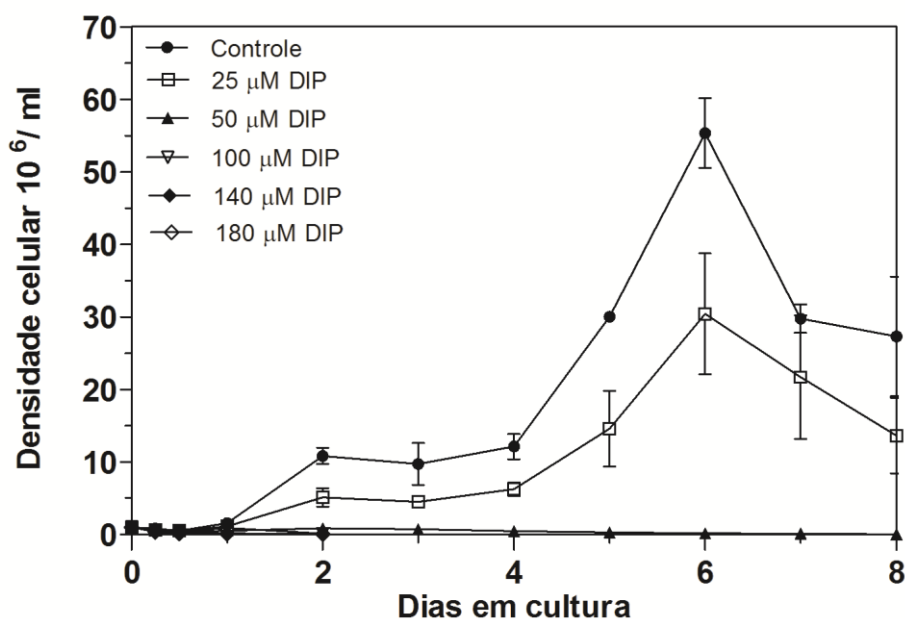


Figura 7. Efeito da depleção de ferro sobre a curva de crescimento dos promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Os parasitos foram cultivados a 25 °C em meio Schneider's suplementado com 20% de soro fetal bovino na ausência ou na presença de 25, 50, 100, 140 e 180 μM do quelante de ferro DIP. O crescimento dos promastigotas foi monitorado diariamente por oito dias. As contagens foram feitas em câmara de Neubauer. As barras representam as médias e o erro padrão obtido a partir de três experimentos independentes.

4.1.2. Avaliação da citotoxicidade do DIP sobre as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

A citotoxicidade do quelante de ferro DIP sobre as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi avaliada após 24 e 48 h a partir de ensaios utilizando o indicador de oxidação e redução Alamar Blue® (Figura 8). Observou-se que existe uma relação dose dependente entre a fluorescência emitida e a concentração do quelante de ferro. As concentrações de 100, 140 e 180 μM de DIP reduziram significativamente a fluorescência emitida após 24 e 48 horas de tratamento quando comparadas com o controle ($P < 0,05$). Também foi observada uma relação entre o tempo de incubação e a fluorescência emitida. Nos promastigotas tratados com 100, 140 e 180 μM de DIP houve uma

redução nos valores de fluorescência após 48 h de incubação em relação aos parasitos tratados por apenas 24 h. Observou-se que o controle, bem como os parasitos tratados com 25 e 50 μM , apresentaram maiores valores de fluorescência após 48 h de incubação (Figura 8). As concentrações inibitórias (IC_{50}) de DIP, responsáveis pela redução de 50% da viabilidade celular, foram calculadas após 24 e 48 h com base na relação entre a concentração do quelante de ferro e a fluorescência emitida pela redução da resazurina. Os valores de IC_{50} calculados foram de 100 μM após 24 h e 83,2 μM após 48h.

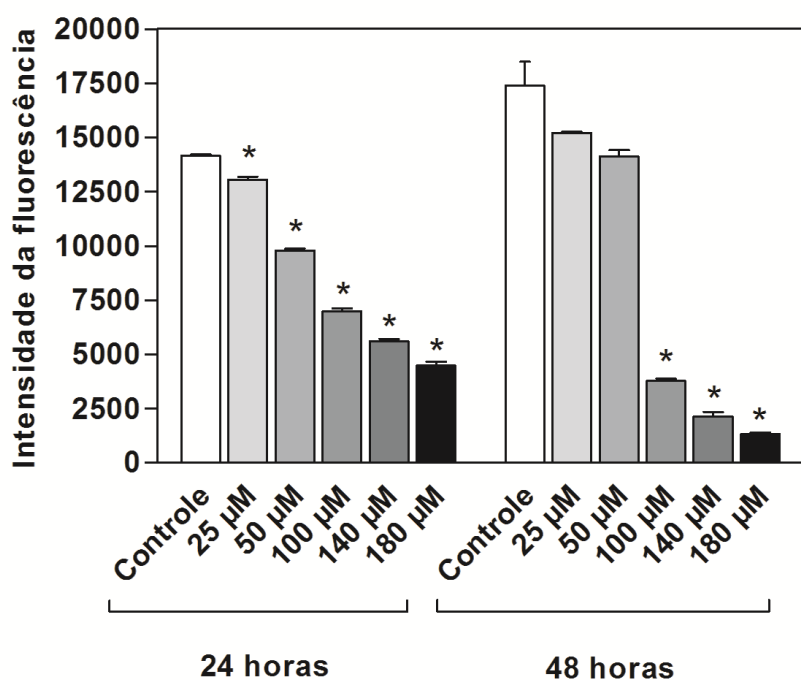


Figura 8. Citotoxicidade do quelante de ferro DIP sobre os promastigotas de *L. (V.) braziliensis* após 24 e 48 h de cultivo. Os parasitos foram cultivados a 25 °C em meio Schneider's suplementado com 20% de soro fetal bovino na ausência ou na presença de 25, 50, 100, 140 e 180 μM do DIP. Os gráficos ilustram a relação entre o tempo de incubação e a fluorescência emitida após a redução da resazurina. As barras representam as médias e o erro padrão obtidos a partir de três experimentos independentes. Os asteriscos representam uma redução significativa na fluorescência após o tratamento com relação ao controle experimental segundo o teste T de Student ($p < 0,01$).

4.1.3. Reversibilidade do efeito do quelante DIP sobre a proliferação de *L. (V.) braziliensis*

Para avaliar se a proliferação dos promastigotas de *L. (V.) braziliensis* poderia ser recuperada após o tratamento com DIP, parasitos previamente tratados com 100 μM de DIP foram reinoculados em meio Schneider's fresco na ausência do quelante e contados em câmara de Neubauer por oito dias. Os parasitos tratados por 24 ou 48 h recuperaram sua proliferação após serem reinoculados em meio fresco alcançando a fase estacionária de crescimento no mesmo dia que os parasitos cultivados na ausência do DIP (sexto dia). Mesmo assim, foi possível observar que os parasitos reinoculados em meio fresco apresentaram menor densidade celular e crescimento mais lento durante a etapa inicial da curva de crescimento (do primeiro ao terceiro dia). Os parasitos que permaneceram na presença de 100 μM de DIP morreram no 4º dia de tratamento com o quelante (Figura 9).

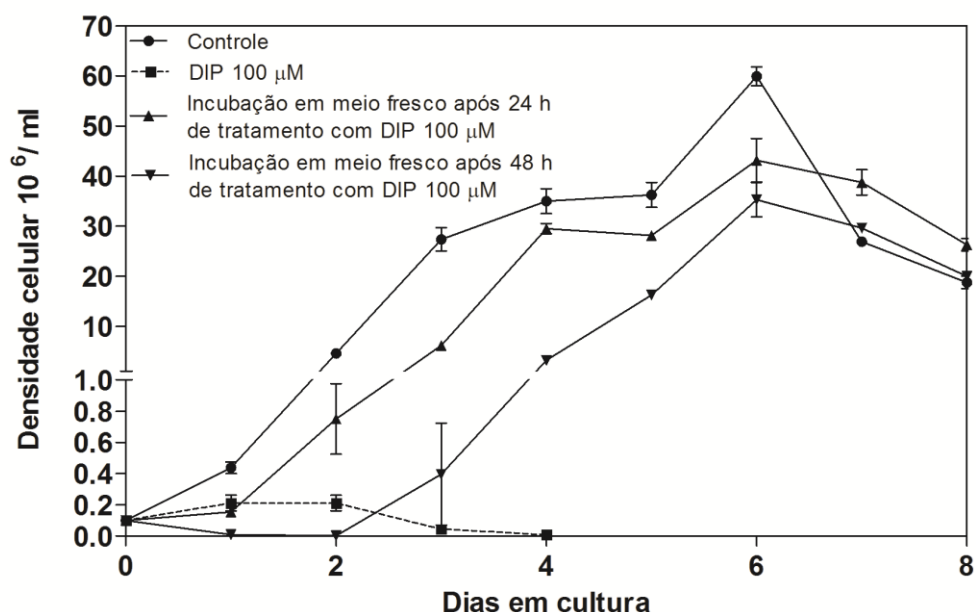


Figura 9. Reversibilidade do efeito do quelante de ferro DIP sobre a proliferação de *L. (V.) braziliensis*. Os parasitos foram incubados com 100 μM do DIP e ressuspensos em meio Schneider's fresco após 24 ou 48 h de tratamento. A densidade celular foi determinada diariamente por oito dias através de contagens em câmara de Neubauer. Tanto o crescimento dos parasitos cultivados na ausência do DIP como a proliferação daqueles cultivados continuamente na presença do quelante também foram monitorados. As barras representam as médias e o erro padrão obtidos a partir de três experimentos independentes.

4.1.4. Efeito da depleção de ferro sobre a ultraestrutura de *L. (V.) braziliensis*

A depleção de ferro induzida pelo quelante DIP inibiu a proliferação e reduziu a viabilidade das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* conforme observado na curva de crescimento e no ensaio de avaliação da citotoxicidade. Para investigar o efeito da depleção de ferro sobre a ultraestrutura do parasito, a morfologia dos promastigotas cultivados na ausência e na presença de 100 µM do quelante DIP foi comparada. A análise ultraestrutural revelou grande dano à mitocôndria do parasito (Figura 10). A organela apresentou grande aumento de volume, perda da membrana interna e redução da elétrondensidade da matriz (Figura 10B-E, asteriscos pretos). Após o tratamento, a mitocôndria também apresentou estruturas membranares concêntricas em seu interior (Figura 10B, D; setas), contudo, não houve dano ao cinetoplasto. Além disso, foi possível detectar uma ruptura no complexo de Golgi (Figura 10C, E; asteriscos brancos) e a presença de extensos vacúolos citoplasmáticos (Figura 10 D-E; V). Nenhum dano ao DNA nuclear foi observado (Figura 10; N).

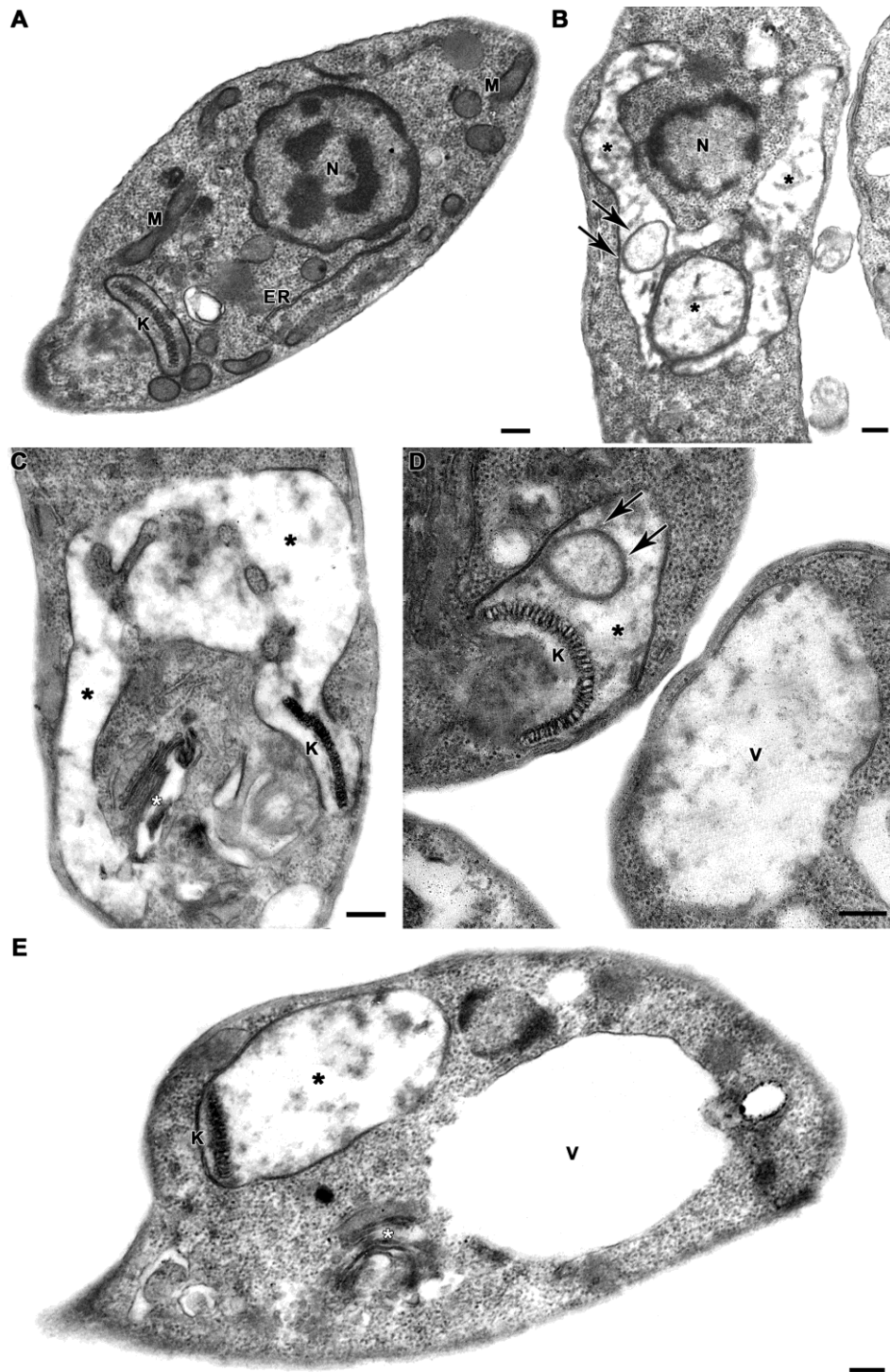


Figura 10. Efeito da depleção de ferro sobre a ultraestrutura dos promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. (A) Os promastigotas cultivados na ausência do quelante de ferro DIP apresentam cinetoplasto (K), mitocôndria (M), retículo endoplasmático (ER) e núcleo (N) normais. (B-E) Promastigotas cultivados na presença de 100 μ M do DIP por 24 h apresentaram aumento do volume mitocondrial, perda da crista e da matriz (asteriscos pretos) e estruturas membranares concêntricas no interior da mitocôndria (setas pretas). Não foram observadas alterações no cinetoplasto. O tratamento com 100 μ M do DIP por 24 h também causou dano ao complexo de Golgi (asteriscos brancos) além de vacuolização no citoplasma (V). Barras = 200 nm.

4.1.5. Efeito da depleção de ferro sobre o potencial de membrana mitocondrial de *L. (V.) braziliensis*

A depleção do ferro alterou a ultraestrutura da mitocôndria de *L. (V.) braziliensis* e diminuiu os valores de fluorescência emitidos pela redução da rezasurina. Para dar continuidade à avaliação do efeito da depleção do ferro sobre a mitocôndria do parasito o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi determinado após 24 e 48 h de cultivo na ausência e na presença de 25, 50 e 100 μM do quelante DIP. Os promastigotas cultivados sob as condições especificadas acima foram aliqotados em duas amostras, uma para incubação com TMRE e outra para incubação com PI. A fluorescência emitida pela TMRE nas formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi analisada por citometria de fluxo e observou-se que o tratamento com DIP reduziu o $\Delta\Psi_m$ de forma dose dependente. As medianas da fluorescência da TMRE nos parasitos tratados com o quelante apresentaram diferenças significativas em relação ao controle ($p \leq 0.03$) (Tabela 3). Ademais, o cálculo do índice de variação (IV) permitiu visualizar que a incubação com 25, 50 e 100 μM de DIP induziu a redução da fluorescência da TMRE em 9, 28 e 40% após 24 h e 7, 2 e 25% após 48 h respectivamente (Tabela 3). Como mencionado anteriormente, o FCCP é um composto que age aumentando a permeabilidade das membranas biológicas ao íon H^+ . Nas formas promastigotas incubadas com FCCP, o $\Delta\Psi_m$ foi dissipado de modo que a fluorescência da TMRE foi reduzida em 74% nos promastigotas cultivados por 24 h e em 52% naqueles cultivados por 48 h. Desta forma, as células incubadas com FCCP funcionaram como controle positivo da marcação pela TMRE, garantindo a entrada do composto na mitocôndria.

Tabela 3: Análise do $\Delta\Psi_m$ das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por citometria de fluxo. Os promastigotas foram cultivados na ausência e na presença de 25, 50 e 100 μM de DIP por 24 e 48 h. O percentual de marcação pela TMRE e o índice de variação relativo a essa marcação foram calculados. Os parasitos incubados com FCCP funcionaram como controle negativo da marcação pela TMRE.

	% TMRE ⁺		Índice de variação (IV) ¹	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Controle	96.0 \pm 1.1 ²	98.0 \pm 0.7	0.00	0.00
Controle + 10 μM FCCP	12.0 \pm 8.2*	32.1 \pm 5.3*	-0.74	-0.52**
25 μM de DIP	95.6 \pm 2.4	94.6 \pm 3.8	-0.09**	-0.07
50 μM de DIP	93.3 \pm 3.8	96.4 \pm 3.2	-0.28**	-0.02
100 μM de DIP	89.3 \pm 6.3	73.9 \pm 12.0*	-0.40**	-0.25**

TMRE⁺ = promastigotas marcados pela tetrametilrodamina;

FCCP = carbonil cianeto 4-(trifluoro-metoxi) fenildrazona

¹ IV = (MT – MC)/MC, onde MT corresponde à mediana da fluorescência do TMRE dos parasitos tratados e MC corresponde à mediana da fluorescência.

² Média e desvio padrão de quatro experimentos independentes. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle (* p \leq 0.01; ** p \leq 0.03) segundo o teste de Mann-Whitney.

4.1.6. Efeito da depleção de ferro sobre a integridade da membrana celular de *L. (V.) braziliensis*

Com o objetivo de demonstrar se a dissipação do $\Delta\Psi_m$ estava relacionada com a permeabilização da membrana celular, uma alíquota dos parasitos foi incubada com PI. A incubação das formas promastigotas com PI demonstrou que o quelante de ferro não permeabiliza a membrana celular, uma vez que o percentual de células marcadas foi semelhante em parasitos tratados e não tratados (Figura 11). As células incubadas com 0,1% de saponina funcionaram como controle positivo da marcação pelo PI. Nesta condição, o detergente permeabilizou a membrana celular garantindo a marcação pelo PI (Figura 11).

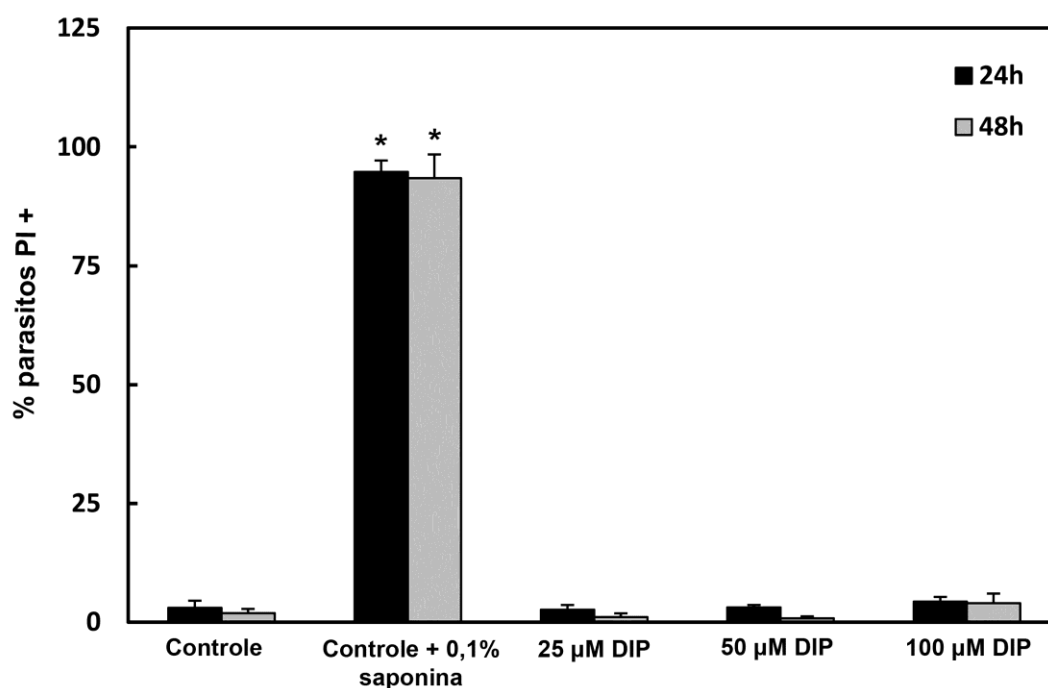


Figura 11. Análise da integridade da membrana plasmática dos promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por citometria de fluxo. Os promastigotas foram cultivados na ausência e na presença de 25, 50 e 100 µM de DIP por 24 e 48 h. Os parasitos usados como controle positivo foram tratados com 0,1% de saponina. Todas as amostras foram marcadas com iodeto de propídeo (PI) e analisadas por citometria de fluxo. A média e o desvio padrão de cada condição foram obtidos a partir de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (* $p \leq 0.05$).

4.1.7. Análise da fragmentação do DNA nuclear de *L. (V.) braziliensis* após o tratamento com DIP

Embora a depleção de ferro tenha alterado a ultraestrutura da mitocôndria de *L. (V.) braziliensis*, não foram observados danos ao DNA nuclear através da microscopia eletrônica de transmissão. Para investigar uma possível alteração do DNA nuclear induzida pelo tratamento com DIP foi realizada uma microscopia de fluorescência utilizando os corantes TUNEL e DAPI *in situ*. Como a DNase induz a fragmentação do DNA, os promastigotas tratados com esta enzima foram usados como controle positivo do ensaio. Observou-se que o DNA dos promastigotas cultivados tanto na ausência quanto na presença de 100 µM de DIP por 24 e 48 h foram marcados exclusivamente pelo DAPI (Figura 12). Por outro lado, os promastigotas

tratados com DNase foram marcados pelo TUNEL mas não pelo DAPI (Figura 12). Esses resultados indicaram que o tratamento com o quelante de ferro DIP não induz a fragmentação do DNA nuclear de *L. (V.) braziliensis*.

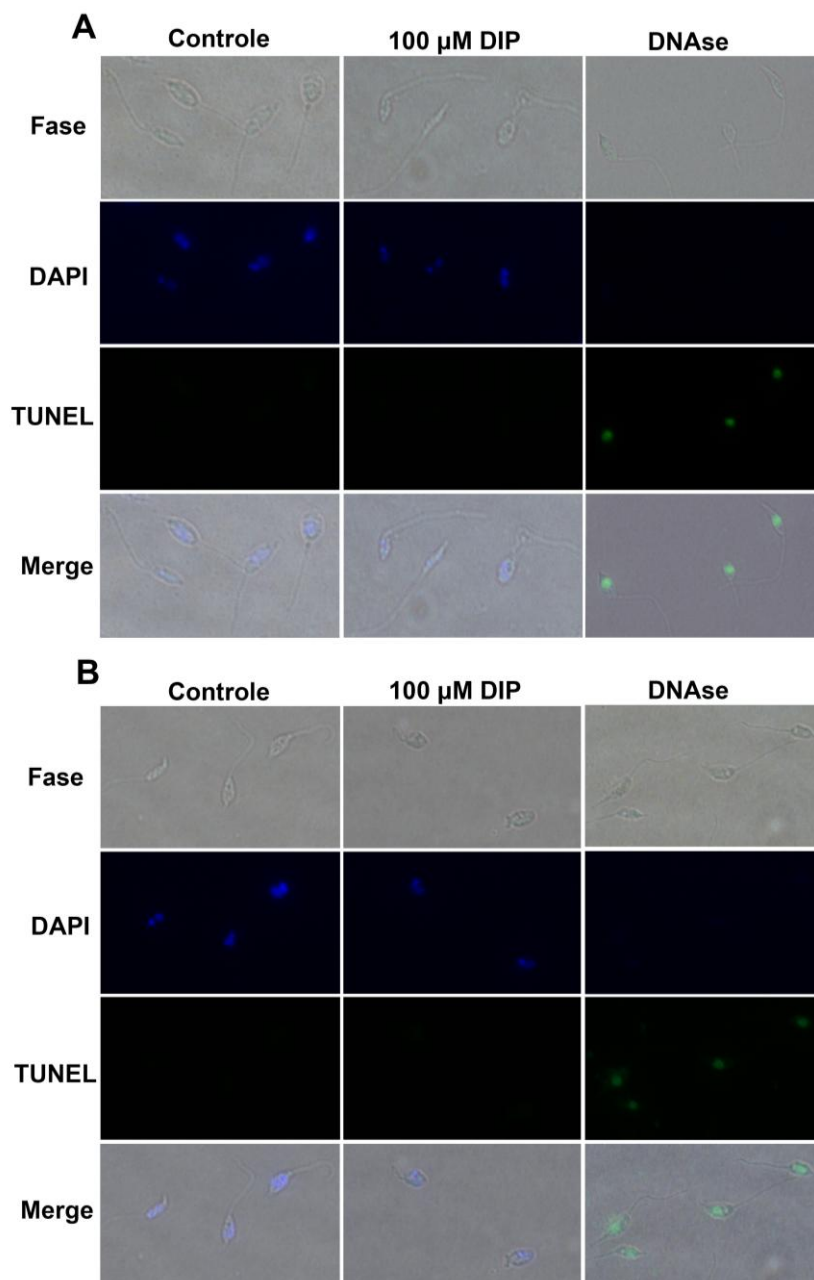


Figura 12. TUNEL. Promastigotas cultivados na ausência e na presença de 100 µM do quelante DIP por 24 h (A) e 48 h (B) foram analisados por microscopia de contraste de fases e microscopia de fluorescência no aumento de 100 X. O marcador DAPI (azul) detectou núcleo e cinetoplasto intactos tanto em promastigotas cultivados em meio controle quanto nos tratados com DIP. O marcador TUNEL (verde) detectou fragmentação do DNA exclusivamente em promastigotas tratados com DNase. As imagens mescladas (Merge) indicam a localização do núcleo e do cinetoplasto dentro das células.

4.1.8. Efeito da depleção de ferro sobre a expressão proteica em *L. (V.) braziliensis* através de eletroforese 2D e espectrometria de massas (MALDI-MS/MS)

Para investigar o efeito do quelante de ferro DIP sobre a expressão proteica de *L. (V.) braziliensis*, extratos totais de promastigotas cultivados na ausência e na presença de 100 μ M de DIP por 24 h foram submetidos à eletroforese 2D (Figura 13). A análise das imagens foi feita a partir da comparação de géis obtidos de três suspensões distintas de parasitos para cada condição avaliada. A detecção dos “spots” e a comparação entre as proteínas expressas foram realizadas através do programa PDQuest (BioRad). A intensidade de cada “spot”, medida em partes por milhão (PPM), serviu como base para a comparação entre a expressão de proteínas em parasitos cultivados na presença ou na ausência do quelante de ferro. Os “spots” que exibiram aumento ou redução de duas vezes em sua intensidade foram considerados como diferencialmente expressos. O “spot” 19, correspondente à enzima citocromo C oxidase, apresentou uma tendência à redução em meio depletado de ferro, sendo incluído nas análises. A redução da expressão de diversas subunidades desta enzima durante a privação do metal foi detectada posteriormente por LC-MS/MS após a extração das proteínas segundo o método MED-FASP. Todas as proteínas diferencialmente expressas foram identificadas por MALDI-MS/MS (Tabela 4). Adicionalmente, para confirmar que a diferença de intensidade entre os “spots” representa uma diferença de expressão proteica entre as duas condições, também foram caracterizados “spots” cujas intensidades não variaram na ausência ou na presença do quelante DIP (Anexo 8.1). Nove proteínas tiveram sua expressão diminuída em parasitos cultivados na presença do quelante de ferro (Figura 14, Tabela 4). Imagens ampliadas das diferentes regiões dos géis demonstram os “spots” que sofreram redução na expressão devido à depleção de ferro (Figura 14 A-D). A intensidade de cada “spot” diferencialmente expresso está representada nos histogramas tridimensionais e nos gráficos de barras dispostos em conjunto com as respectivas regiões ampliadas (Figura 14 A-D). A função (biológica e/ou molecular) das proteínas que apresentaram redução em sua expressão foi inferida a partir dos termos de ontologia gênica (GO, por gene ontology)

disponíveis no TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) ou usando a ferramenta InterProScan Sequence Search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) (Tabela 4).

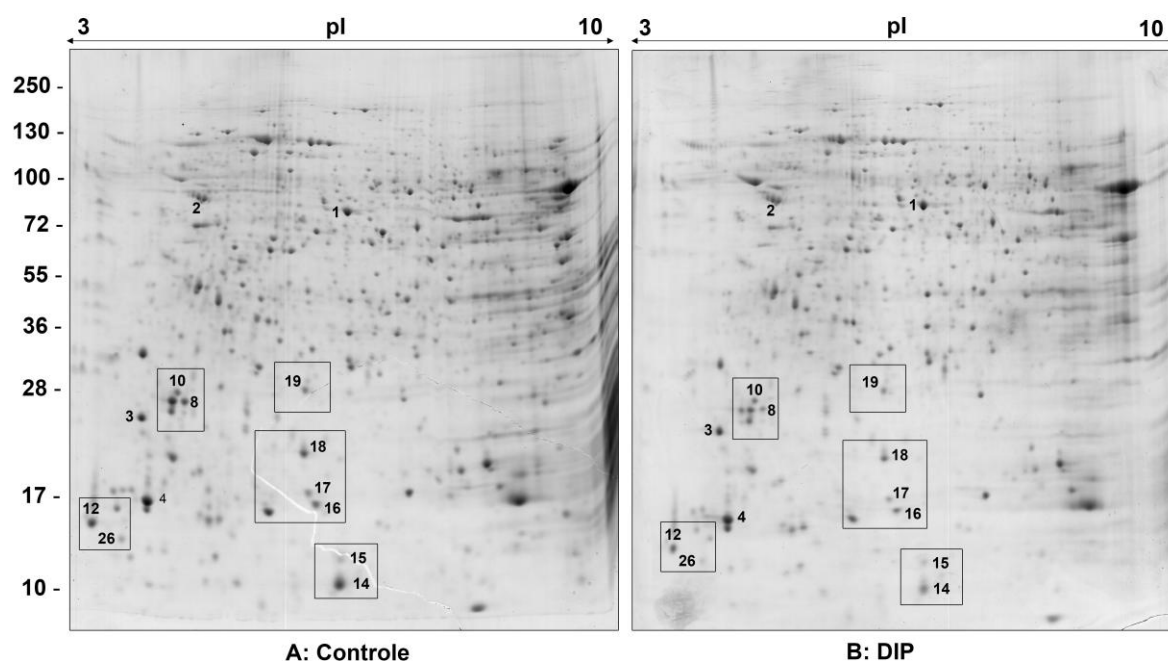


Figura 13. Géis 2D contendo proteínas solúveis de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Os promastigotas foram cultivados na ausência (A) ou na presença (B) de 100 μ M do quelante de ferro DIP por 24 h. As proteínas foram separadas em uma faixa de pH de 3 a 10 em géis de poliacrilamida 12%. Os géis foram corados com Coomassie G-250 possibilitando a visualização dos spots de proteína. As proteínas diferencialmente expressas estão numeradas e destacadas por quadrados, os detalhes de sua identificação encontram-se na tabela 4. Os spots cuja intensidade não variou entre as duas condições estão numerados de 1 a 4 e não estão destacados por quadrados. As identificações desses spots estão no Anexo 8.1.

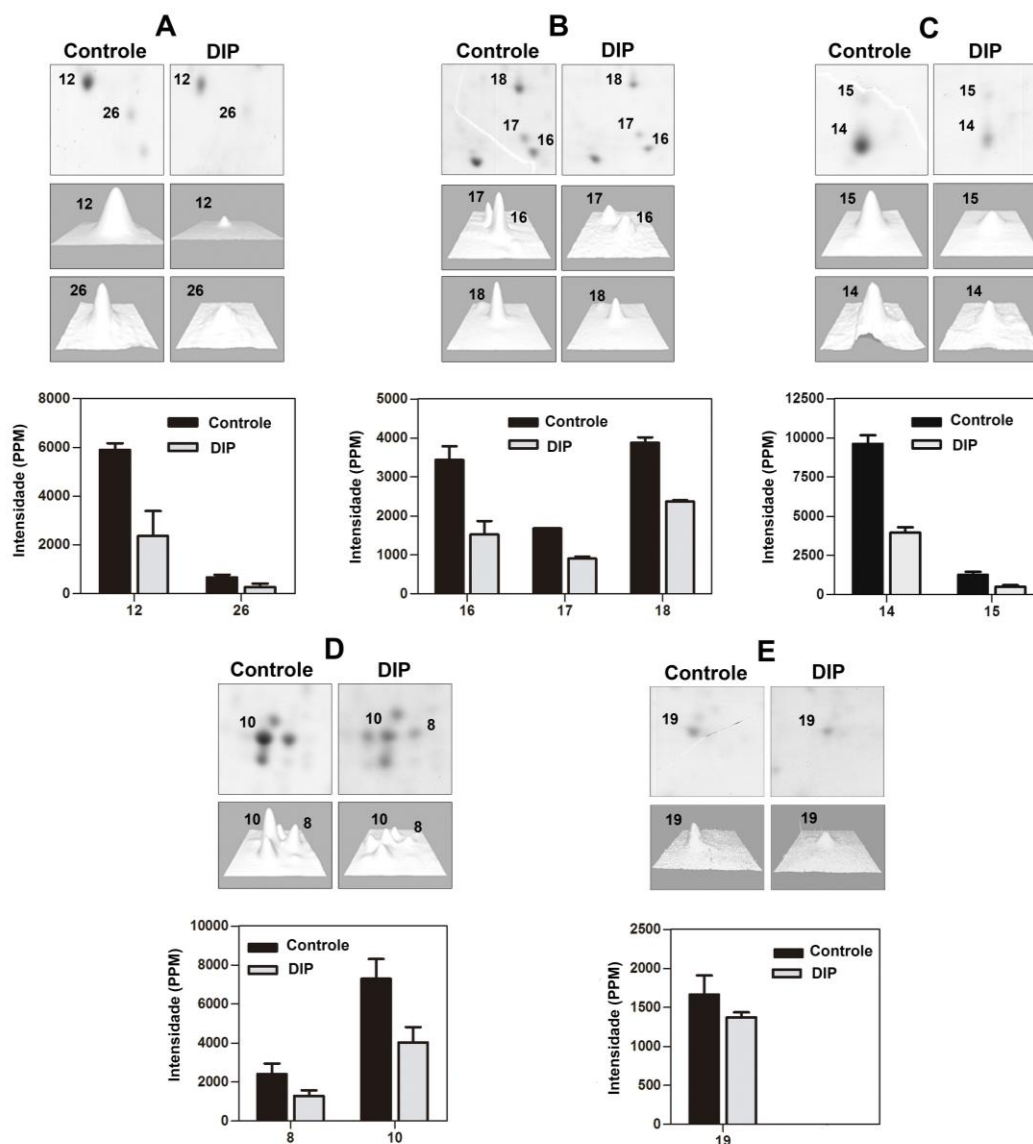


Figura 14. Ampliações das regiões dos géis contendo proteínas diferencialmente expressas nos parasitos cultivados na presença do quelante de ferro DIP. Os spots estão numerados de acordo com a Figura 10. As proteínas diferencialmente expressas estão identificadas na Tabela 4. O grau de diferenciação da expressão das proteínas está representado nos histogramas tridimensionais e nos gráficos de barra. Nestes gráficos, cada barra representa a média das intensidades em PPM e o desvio padrão calculado a partir de três experimentos independentes.

Tabela 4. Proteínas de que sofreram redução em sua expressão em meio depletado de ferro. Os promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram cultivados na ausência ou na presença de 100 μ M do quelante de ferro DIP por 24 h. As proteínas foram separadas por eletroforese 2D e identificadas por espectrometria de massas (MALDI-MS/MS) usando o programa Mascot® e a base de dados não redundante do NCBI.

Código	Nome da proteína	Nº de acesso do NCBI	PM teórico (PM exp)	PI teórico (PI exp)	Matching pep./ Pep. Identificados por MS/MS	Sequência dos peptídeos	Erro \pm PPM	Score da Proteína	PB, CC e FM
8	Chain A, <i>Leishmania braziliensis</i> Eukaryotic Initiation Factor 5a	1X6O_A	18.93 (27)	5.42 (5.21)	3/2	TYPLAAGALK VSIVATDIFTGNR LEDQAPSTHNVEVPFVK	-50 -45 -49	215	PB: Regulação da tradução; FM: Liga-se ao RNA
10	Chain A, <i>Leishmania braziliensis</i> Eukaryotic Initiation Factor 5a	1X6O_A	18.93 (27)	5.42 (5.21)	3/3	TYPLAAGALK VSIVATDIFTGNR LEDQAPSTHNVEVPFVK	-64 -58 -71	295	PB: Regulação da tradução; FM: Liga-se ao RNA
12	Calmodulin A <i>Trypanosoma brucei</i>	AAA30174	16.82 (13.5)	4.10 (4.2)	6/6	A■DQLSNEQISEFK EAFSLFDKDGDTITTK VFDKDGNGFNAAELR DGNGFNAAELR LTDEEVDEM▲IR EADVGDGQINYEYEFVK	-94 -95 -57 -51 -89 -95	546	CC: Flagelo; MF: Ligaçã de íons de cálcio
14	Hypothetical protein <i>Leishmania braziliensis</i>	XP_001563170	13.30 (10)	5.71 (5.98)	5/5	KFGYVDYTK FGYVDYTK AQFDDVR STTTDKIEVTVVK SPDFDAIYEQQQK	-84 -81 -54 -91 -91	365	ND
15	Hypothetical protein <i>Leishmania infantum</i>	XP_001467133	13.69 (12)	5.9 (5,97)	1/1	FIFLSNPDHWR	-48	60	ND
16	Ubiquitin conjugated enzyme E2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	XP_812602	16.87 (14.5)	6.08 (5,84)	1/1	VLLSVCSSLTDPNPDDPLVPDIAR	-66	77	PB: Regulação do metabolismo das proteínas FM: Modificações pós-traducionais

17	Ubiquitin-conjugating-enzyme like protein <i>Leishmania braziliensis</i>	XP_001563284	16.26 (15.2)	5.93 (5.81)	2/2	DTEDIYFHYWNGTIVGPPSSSTFEYR VNLPVDPDGTVNR	-52 -81	59	PB: Regulação do metabolismo das proteínas; FM: Modificações pós-traducionais
18	Ribonucleoprotein p18 mitochondrial precursor <i>Leishmania braziliensis</i>	XP_001563480	21.69 (20)	6.74 (5.78)	5/4	KYDLFGYEVDNTAPWIEK NCPDLETYNATLQR IFEAPSKQDKPVDNESK ADGKEHPSALAQQQSLFEIK EHPSALAQQQSLFEIK	-76 -75 -92 -74 -89	462	CC: mitocôndria
19	Cytochrome c oxidase subunit V [<i>Leishmania infantum</i>]	XP_001470514	22.38	6,1	3/2	GWDNAALDTIYSSMLR VFLPPLGDPHR GAEIPDHVFQTPAVIER	-90 -88 -92	278	PB: regulação de processos metabólicos; CC: mitocôndria; FM: transporte de elétrons
26	60S acid ribosomal protein P2 <i>Leishmania braziliensis</i>	XP_001566999	10.65 (13)	4.38 (4.6)	3/3	AAGVAIELSR VDALFQELEGKSFDELM▲TEGR LVGSGSAAPAAAASTAGAAVAAAADAK	-71 -87 -85	265	PB: Elongação traducional; CC: ribossomo; MF: Componente estrutural do ribossomo

CC = Componente Celular; Da = Dalton; Fe = Ferro; FM = Função Molecular; ND = não detectado; PB = Processo Biológico; pI = ponto isoelétrico; PM = Peso Molecular; PPM = Partes por milhão;

▲ = oxidação; ■ = acetilação

4.1.9. Efeito da depleção de ferro sobre a expressão gênica em *L. (V.) braziliensis*

A análise por eletroforese 2D e espectrometria de massas demonstrou que nove proteínas tiveram sua expressão reduzida em meio depletado de ferro. Como mencionado anteriormente, a qPCR foi utilizada em dois momentos distintos durante a execução da tese. Nesse primeiro momento, com o objetivo de avaliar se a expressão diferencial das proteínas poderia resultar de uma modulação ao nível do RNAm, foram desenhados primers específicos para os genes que codificam cada proteína. A expressão gênica de cada alvo foi determinada após 24 h de cultivo na ausência e na presença do quelante DIP. Os resultados demonstraram que a depleção de ferro não induz diferença na expressão do RNAm dos alvos testados, indicando que para esses genes não há correlação entre o nível de RNAm e de proteína (Figura 15).

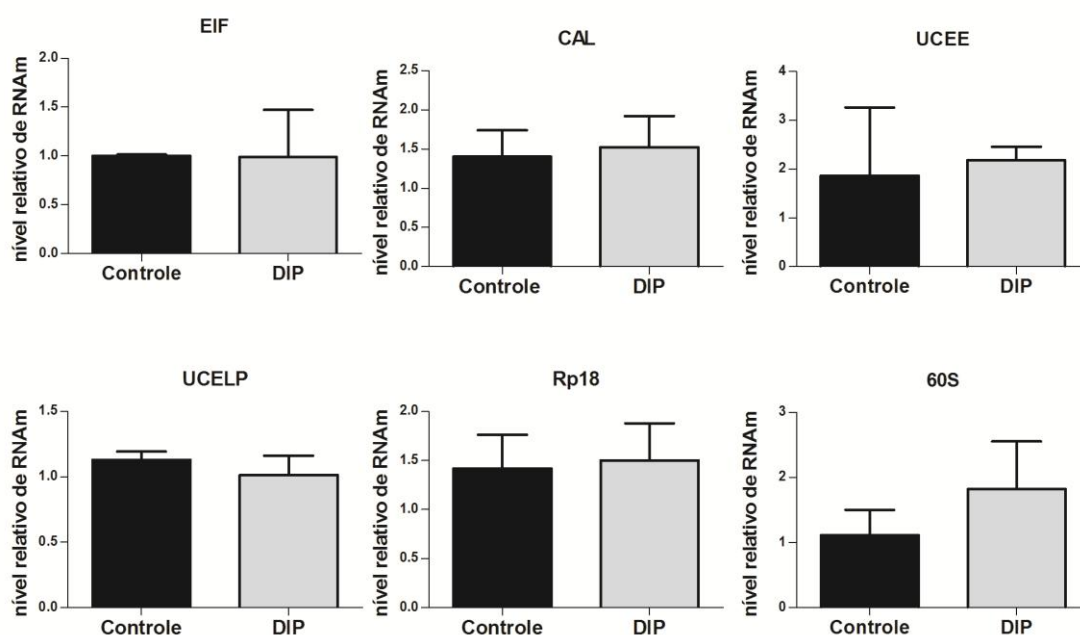


Figura 15. Níveis de expressão do RNAm em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* cultivados na ausência (controle) e na presença de 100 µM de DIP por 24 h. Os níveis de expressão dos genes EIF, CAL, UCEE, UCELP, Rp18 e 60S foram mensurados por qPCR. Os valores demonstrados resultam da normalização da expressão dos genes alvos com relação ao gene endógeno utilizado (actina). O teste T de Student foi usado para comparar a expressão gênica de promastigotas cultivados na presença do quelante DIP com relação ao controle.

4.2. Efeito do quelante de ferro DIP sobre a captação de ferro e a função mitocondrial de *L. (V.) braziliensis*

Neste bloco de resultados foram investigados a captação e o transporte de ferro pelos promastigotas. Com esta finalidade foram feitos ensaios de quantificação do ferro e do heme bem como a análise da expressão gênica dos transportadores LIT1 e LHR1. Adicionalmente, para avaliar o efeito da depleção de ferro sobre a função mitocondrial dos parasitos, a expressão de genes mitocondriais, o consumo de oxigênio e a atividade enzimática do complexo IV foram mensurados.

4.2.1. Efeito da depleção de ferro sobre a concentração intracelular e extracelular do metal em *L.(V.) braziliensis*

As concentrações intracelular e extracelular de ferro em *L. (V.) braziliensis* foram determinadas pelo método colorimétrico da ferrozina em promastigotas cultivados na ausência e na presença de 50 e 100 μM do quelante DIP por 2, 24 e 48 h. Após 2 h de cultivo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações intracelulares de ferro nas condições testadas. No entanto, após 24 e 48 h, houve diferença significativa entre as concentrações intracelulares de ferro dos promastigotas cultivados na ausência do quelante e na presença de 100 μM de DIP. Também foi observada diferença significativa entre os promastigotas cultivados com 50 e 100 μM de DIP após 48 h. Os promastigotas cultivados na ausência do quelante DIP também apresentaram um aumento na concentração intracelular de ferro proporcional ao tempo de cultivo. Por outro lado, aqueles cultivados na presença de 50 μM do quelante só apresentaram aumento na concentração intracelular do metal após 48 h. Finalmente, a concentração intracelular de ferro dos promastigotas cultivados na presença de 100 μM de DIP não sofreu aumento permanecendo constante (em torno de 6 ng de Fe por mg de proteína) após 2, 24 e 48 h (Figura 16).

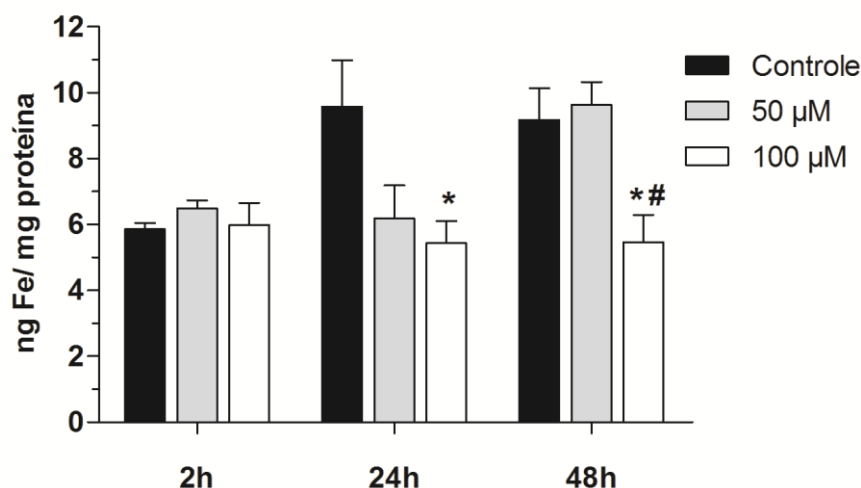


Figura 16: Quantificação do ferro intracelular. Foram analisados promastigotas cultivados por 2, 24 e 48 h ausência ou na presença 50 e 100 μM do quelante DIP. A concentração intracelular de ferro foi obtida pelo método colorimétrico da ferrozina após a lise dos parasitos. A concentração do ferro foi normalizada pela concentração de proteína, sendo expressa em ng (Fe) / mg de proteína. O teste t de Student foi utilizado para comparar os parasitos cultivados em meio controle com os parasitos cultivados na presença de 50 e 100 μM de DIP. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao grupo controle e o jogo da velha indica diferença significativa entre os promastigotas tratados com 50 e 100 μM de DIP (* $p \leq 0.05$).

As concentrações extracelulares de ferro após 2 e 24 h de cultivo foram maiores no meio Schneider não tratado e naquele tratado com 50 μM de DIP, verificando-se uma redução estatisticamente significativa da concentração de ferro no meio tratado com 100 μM do quelante em relação ao controle. Por sua vez, após 48 h, as concentrações de ferro no meio Schneider não tratado e no tratado com 50 μM sofreram uma drástica redução, igualando-se à concentração do metal no meio tratado com 100 μM (Figura 17).

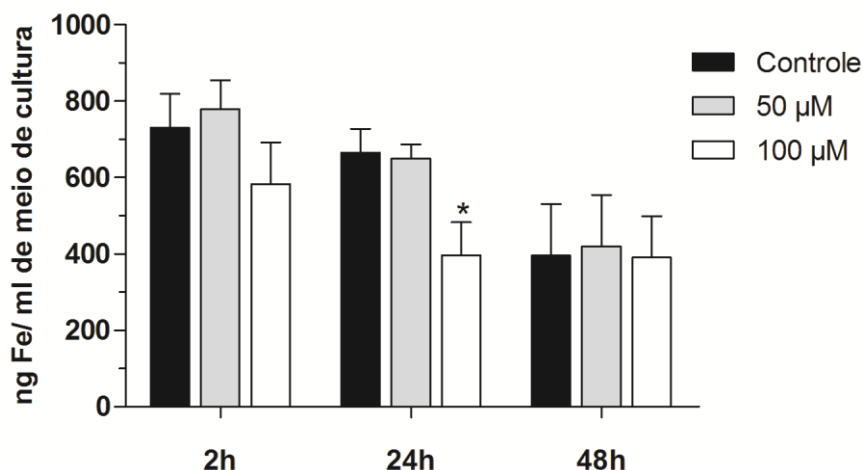


Figura 17: Quantificação do ferro extracelular. O meio Schneider foi avaliado após 2, 24 e 48 h de incubação de *L. (V.) braziliensis* na ausência ou na presença de 50 e 100 µM do quelante DIP. Após o tempo de cultivo os promastigotas foram centrifugados e o sobrenadante foi coletado para análise. A concentração de ferro foi obtida pelo método colorimétrico da ferrozina sendo expressa em ng/ml. O teste t de Student foi utilizado para comparar a concentração de ferro no meio controle e no meio tratado com 50 e 100 µM de DIP. O asterisco indica diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p \leq 0.05$).

4.2.2. Efeito da depleção de ferro sobre a concentração intracelular e extracelular de heme em *L.(V.) braziliensis*

As concentrações intracelular e extracelular de heme em *L. (V.) braziliensis* foram determinadas pelo método da piridina alcalina em promastigotas cultivados na ausência e na presença de 100 µM do quelante DIP por 24 e 48 h. A concentração de 100 µM foi escolhida para esse ensaio, pois foi a única que exibiu diferença significativa na quantificação do ferro total com relação ao controle e também devido à necessidade de uma grande densidade de promastigotas (2×10^9) para quantificar o heme intracelular. A concentração extracelular de heme também foi analisada no meio Schneider fresco, antes de se adicionar os parasitos. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações intracelulares e extracelulares de heme nas condições analisadas (Figuras 18 e 19).

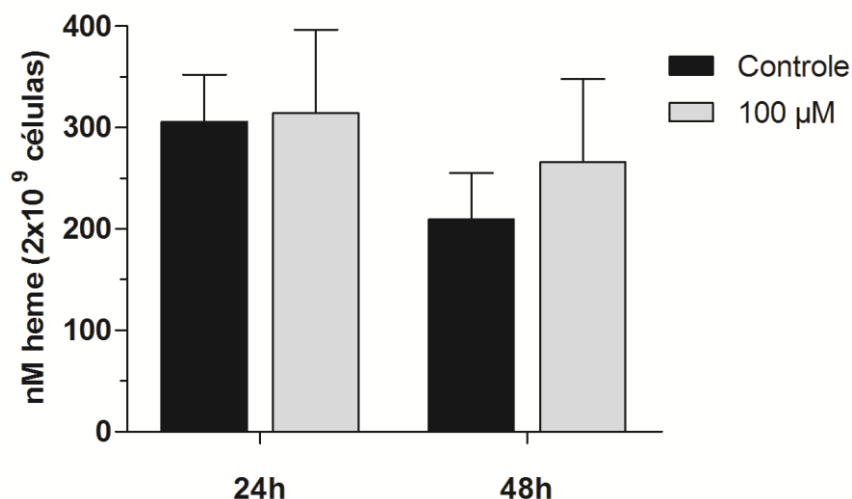


Figura 18: Quantificação do heme intracelular. Foram analisados promastigotas cultivados por 24 e 48 h na ausência ou na presença de 100 μM do quelante DIP. A concentração intracelular de heme foi obtida pelo método da piridina alcalina após a lise de 2×10^9 parasitos. O teste t de Student foi utilizado para comparar os parasitos cultivados em meio controle com os parasitos cultivados na presença de 100 μM de DIP.

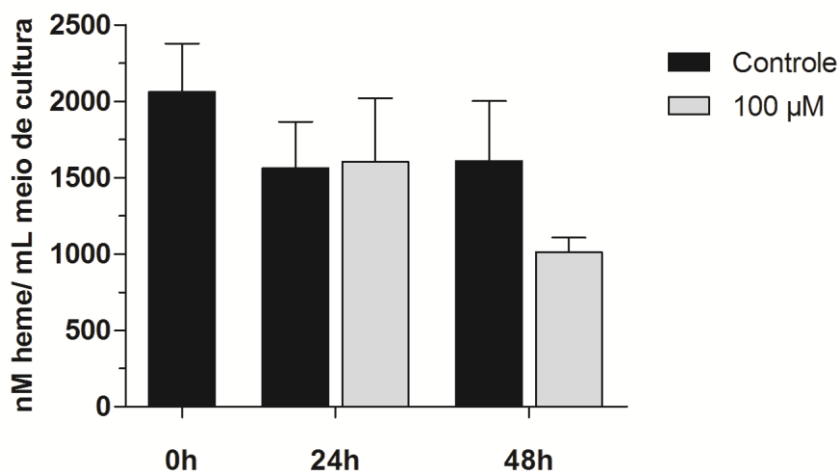


Figura 19: Quantificação do heme extracelular. O meio Schneider foi avaliado fresco e após 24 e 48 h de incubação de *L. (V.) braziliensis* na ausência ou na presença de 100 μM do quelante DIP. A concentração do heme extracelular foi obtida pelo método da piridina alcalina. O teste t de Student foi utilizado para comparar a concentração de heme no meio controle e no meio tratado com 50 e 100 μM de DIP.

4.2.3. Efeito da depleção de ferro sobre a expressão de genes relacionados com a captação do metal em *L. (V.) braziliensis*

Após 24 e 48 h de cultivo na presença de 100 μ M do quelante DIP os promastigotas sofreram uma redução significativa nas concentrações de ferro intracelular e extracelular com relação ao controle. No entanto, mesmo na presença do quelante, os parasitos foram capazes de manter uma reserva intracelular de ferro, indicando que poderiam estar captando o metal do meio extracelular através de transportadores. Sendo assim, a expressão gênica do transportador LIT1 foi avaliada após 24 e 48 h de cultivo dos promastigotas na ausência e na presença de 100 μ M do quelante (Figura 20). Ao contrário das concentrações de ferro, as concentrações de heme intracelular e extracelular não sofreram redução estatisticamente significativa na presença do DIP, indicando que os parasitos poderiam compensar o efeito do quelante captando heme do meio extracelular. Por esta razão, o qPCR também foi utilizado para determinar a expressão gênica do transportador LHR1 (Figura 20). Os resultados demonstraram que o cultivo em meio depletado de ferro induz o aumento significativo da expressão do LIT1 após 24 e 48 h e do LHR1 após 48 h, sugerindo que a depleção de ferro pode regular a expressão desses transportadores.

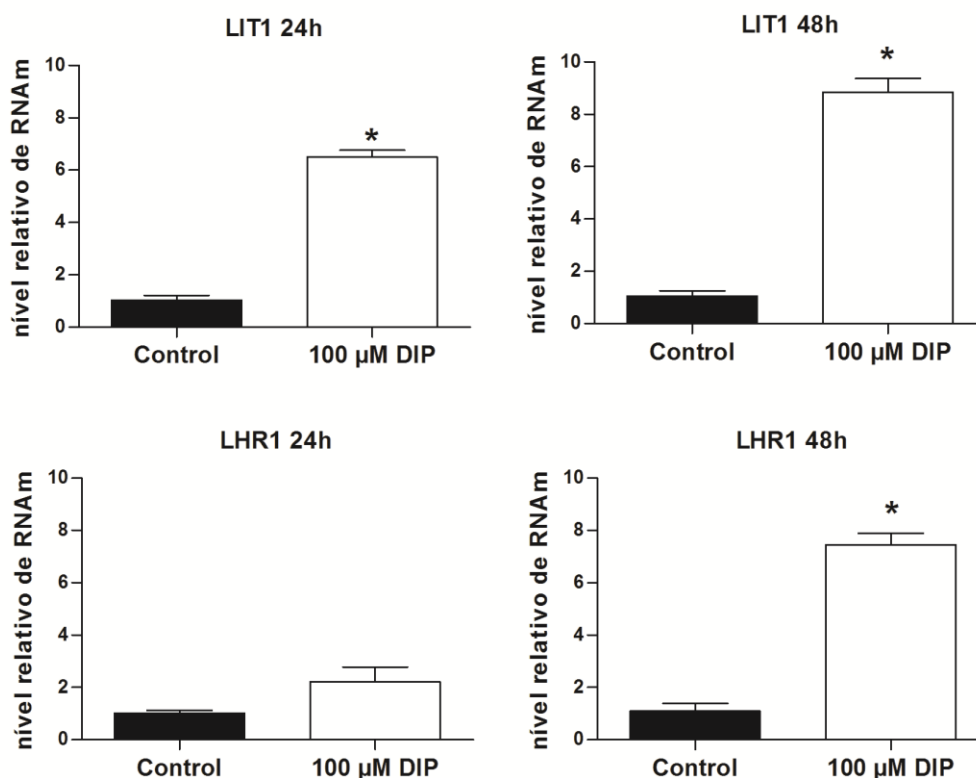


Figura 20. Níveis de expressão do RNAm dos transportadores de ferro (LIT1) e de heme (LHR1). Os promastigotas de *L. (V.) braziliensis* cultivados na ausência (controle) e na presença de 100 μM de DIP por 24 h. Os níveis de expressão dos genes LIT1 e LHR1 foram mensurados por qPCR. Os valores demonstrados resultam da normalização da expressão dos genes alvos com relação aos genes endógenos utilizados (actina e 40S ribossomal). O teste T de Student foi usado para comparar a expressão gênica dos promastigotas cultivados na presença do quelante DIP com relação ao controle. O asterisco indica diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p \leq 0.05$).

4.2.4. Efeito da depleção de ferro sobre a expressão da enzima FeSOD em *L. (V.) braziliensis*

A depleção de ferro induziu um aumento significativo na expressão dos transportadores LIT1 e LHR1 acompanhado de aumento ou manutenção das concentrações intracelulares do metal. Para avaliar se este aumento poderia desencadear a elevação da expressão do RNAm da enzima FeSOD, os promastigotas foram coletados após 24 e 48 h de cultivo na ausência e na presença de 100 μM do quelante de ferro DIP. Os resultados demonstraram um aumento significativo na expressão da FeSOD após 48 h de cultivo (Figura 21).

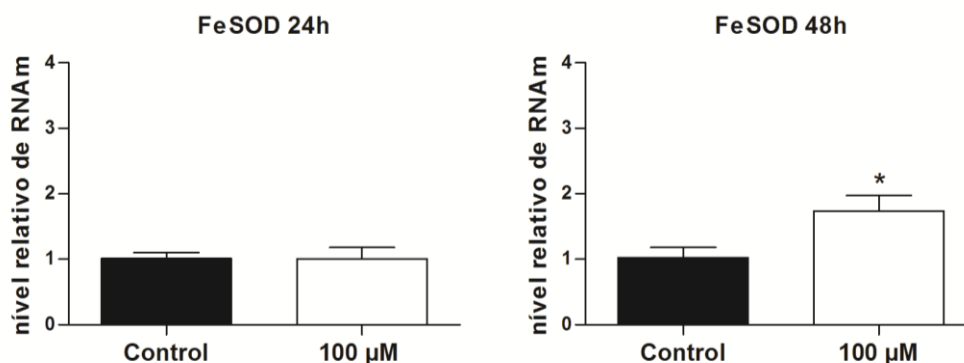


Figura 21. Níveis de expressão do RNAm da enzima antioxidante FeSOD. Os promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram cultivados na ausência (controle) e na presença de 100 μM de DIP por 24 h. A expressão do RNAm da FeSOD foi mensurada por qPCR. Os valores demonstrados resultam da normalização da expressão dos genes alvos com relação aos genes endógenos utilizados (actina e 40S ribossomal). O teste T de Student foi usado para comparar a expressão gênica dos promastigotas cultivados na presença do quelante DIP com relação ao controle. O asterisco indica diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p \leq 0.05$).

4.2.5. Efeito da depleção de ferro sobre a expressão de genes relacionados com a função mitocondrial em *L. (V.) braziliensis*

A depleção de ferro induzida pelo quelante DIP afetou a ultraestrutura da mitocôndria e dissipou o $\Delta\psi_m$ dos promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Também foi observada uma redução na expressão de proteínas mitocondriais após a análise por eletroforese 2D e espectrometria de massas. Para investigar o efeito da depleção de ferro sobre a expressão dos genes que codificam os complexos enzimáticos mitocondriais foram desenhados primers específicos para succinato desidrogenase, citocromo B e citocromo C oxidase (complexos II, II e IV respectivamente). A expressão gênica da ATP sintase em meio depletado de ferro também foi avaliada. Os promastigotas foram coletados após 24 e 48 h de cultivo na ausência e na presença de 100 μM do quelante de ferro DIP. Os resultados demonstraram que o gene que codifica a enzima citocromo C oxidase (complexo IV) apresentou uma redução significativa em sua expressão após 48 h de cultivo na presença de 100 μM do quelante DIP (Figura 22).

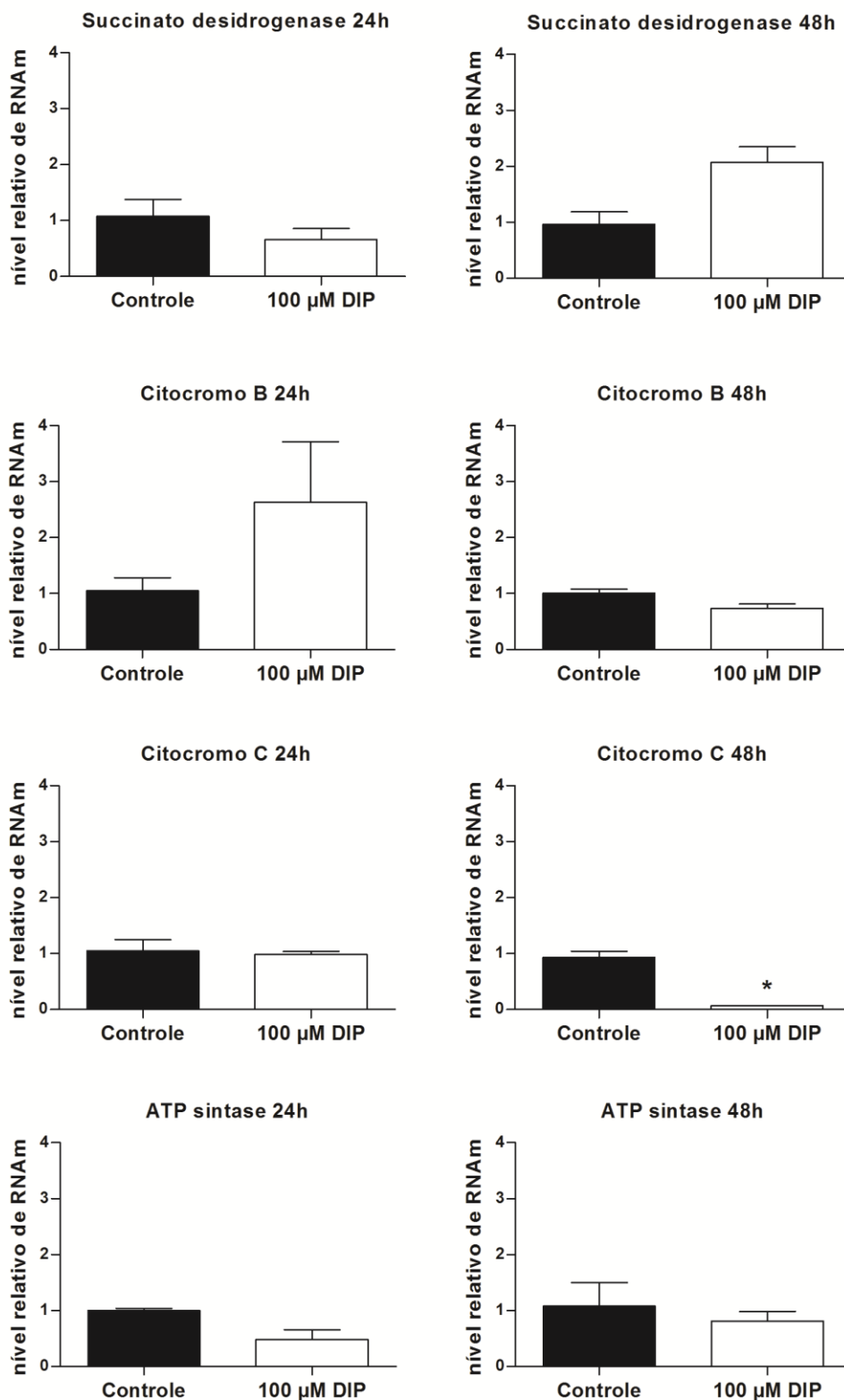


Figura 22. Níveis de expressão do RNAm dos genes relacionados com a função mitocondrial. Os promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram cultivados na ausência (controle) e na presença de 100 μM de DIP por 24 h. Os níveis de expressão dos genes SD, CitB, CitC e ATPs foram mensurados por qPCR. Os valores demonstrados resultam da normalização da expressão dos genes alvos com relação aos genes

endógenos utilizados (actina e 40S ribossomal). O teste T de Student foi usado para comparar a expressão gênica dos promastigotas cultivados na presença do quelante DIP com relação ao controle. O asterisco indica diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p \leq 0.05$).

4.2.6. Efeito da depleção de ferro sobre o consumo de oxigênio em *L.(V.) braziliensis*

Nos itens anteriores foi observado que a depleção de ferro induzida pelo tratamento com DIP danifica a ultraestrutura da mitocôndria, despolariza o potencial de membrana mitocondrial e reduz a expressão do gene que codifica o complexo IV. Para investigar o efeito do quelante sobre a atividade mitocondrial de *L. (V.) braziliensis* o consumo de oxigênio por promastigotas íntegros foi avaliado utilizando um oxígrafo de alta resolução. Neste ensaio observou-se que o tratamento com 100 μM de DIP reduziu o consumo de oxigênio dos promastigotas em cerca de 60% (de 950 para 350 $\text{pmols O}_2/\text{min}/\text{mL}/10^7$ parasitos) demonstrando que a depleção de ferro afeta a atividade mitocondrial de *L. (V.) braziliensis* (Figura 23). Também foi observado que a adição de antimicina A, inibidor do complexo III, reduziu drasticamente o consumo de oxigênio pelos promastigotas de ambos o grupos, indicando que a maior parte do consumo de oxigênio se deve a fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria com o objetivo de sintetizar ATP. No entanto, uma pequena taxa de consumo de oxigênio se manteve em ambos os grupos (cerca de 10 a 30 $\text{pmols O}_2/\text{min}/\text{mL}/10^7$ parasitos) demonstrando que parte do consumo de oxigênio nestes parasitos é independente da mitocôndria (Figura 23). Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o consumo de oxigênio do grupo controle e do grupo tratado após a adição de antimicina A ao sistema indicando que a depleção de ferro também afeta o consumo de oxigênio independente da mitocôndria (Figura 23).

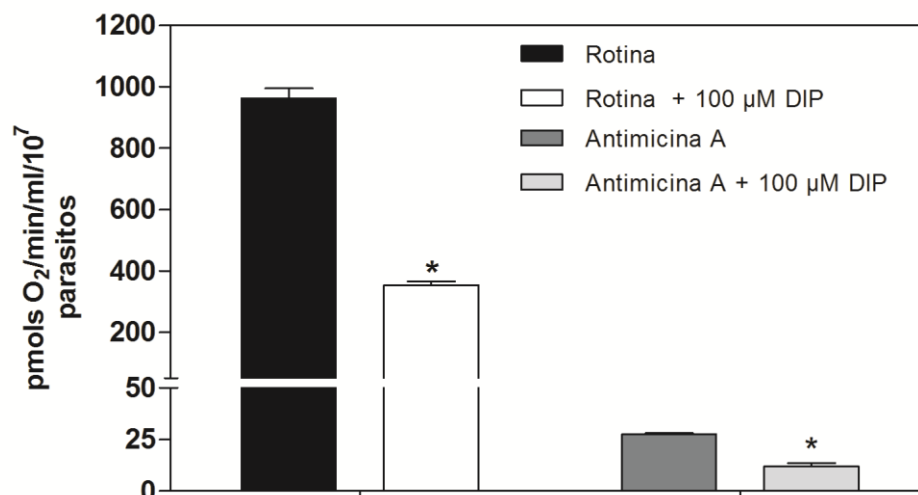


Figura 23. Consumo de oxigênio por promastigotas intactos de *L. (V.) braziliensis*. O consumo de oxigênio foi mensurado em promastigotas intactos cultivados na ausência ou na presença de 100 μM do quelante de ferro DIP por 24 h. O consumo de oxigênio foi inibido pela adição de 2 μM de antimicina A. O teste T de Student foi usado para comparar o consumo de oxigênio dos promastigotas cultivados na presença do quelante DIP com relação ao controle. O asterisco indica diferença significativa em relação ao grupo controle (* p ≤ 0.05).

4.2.7. Efeito da depleção de ferro sobre a atividade da enzima citocromo C oxidase (complexo IV da cadeia de transporte de elétrons) de *L. (V.) braziliensis*

Como demonstrado anteriormente, a expressão da enzima citocromo C oxidase sofreu redução ao nível de RNAm após 48 h de cultivo em meio depletado de ferro. Também se observou uma tendência à redução da expressão desta proteína por eletroforese 2D e espectrometria de massas após 24 h de cultivo na presença do quelante. Em virtude do exposto, a atividade enzimática do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons foi mensurada em um espectrofotômetro após 24 h de cultivo dos promastigotas na ausência e na presença de 100 μM do quelante DIP. A atividade do complexo IV também foi determinada em promastigotas que foram reinoculados em meio Schneider's fresco por 48 h após 24 h de tratamento com 100 μM do DIP. Observou-se que após 24 h de cultivo em meio depletado de ferro a atividade do complexo IV apresentou uma redução estatisticamente significativa com

relação ao controle (Figura 24). Os promastigotas que foram reinoculados em meio fresco após o tratamento com DIP também recuperaram a atividade do complexo IV, apresentando aumento significativo com relação aos parasitos tratados com 100 μ M do DIP (Figura 24).

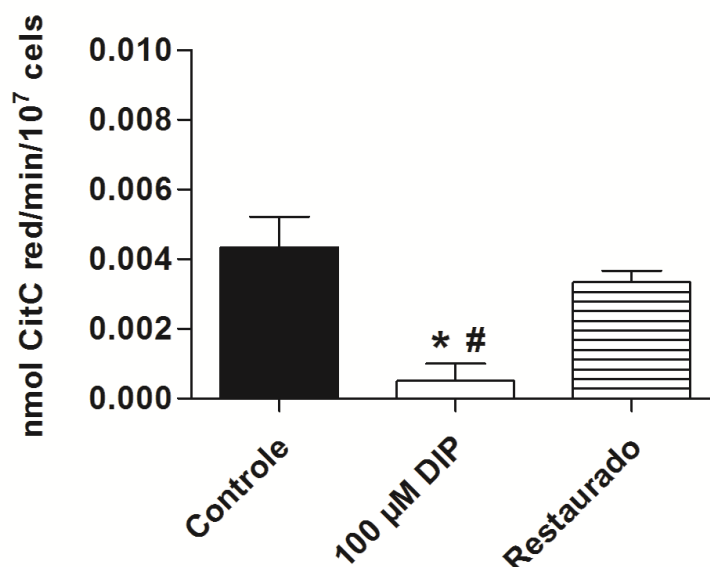


Figura 24. Atividade da enzima citocromo C oxidase (complexo IV). Os promastigotas foram cultivados na ausência de DIP (controle), na presença de 100 μ M de DIP ou foram reinoculados por 48 h em meio Schneider's fresco após 24 h de tratamento com DIP (restaurado). O teste T de Student foi usado para comparar a atividade do complexo IV dos promastigotas cultivados na presença do quelante DIP com relação ao controle e com relação aos promastigotas que tiveram seu crescimento restaurado. O asterisco indica diferença significativa em relação ao grupo controle (* $p \leq 0.05$) enquanto o jogo da velha demonstra diferença significativa em relação ao grupo restaurado (* $p \leq 0.05$).

4.2.8. Efeito da depleção de ferro sobre a expressão proteica em *L. (V.) braziliensis* através de MED-FASP e espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* cultivados em meio depletado de ferro apresentaram redução na expressão de nove proteínas segundo a análise por eletroforese 2D e MALDI-MS/MS. Com a finalidade de ampliar a análise do efeito da depleção de ferro sobre a expressão proteica dos parasitos, as proteínas foram processadas segundo o método MED-FASP e analisadas por LC-MS/MS. Os extratos totais dos promastigotas cultivados na ausência e na

presença de 100 μ M de DIP por 24 h foram comparados. O SDS foi utilizado como agente desnaturante e solubilizante, proporcionando uma extração completa das proteínas incluindo as mais hidrofóbicas localizadas na membrana celular. Além disso, a digestão das proteínas foi realizada simultaneamente com Lysil endopeptidase C e tripsina aumentando o número de peptídeos identificados e a cobertura das sequências peptídicas. A utilização de um analisador de massas de alta resolução acoplado a sistemas integrados de cromatografia permitiu a identificação de um total de 6000 proteínas. Deste total, 647 proteínas foram diferencialmente expressas nas duas condições testadas (Anexo 3). A detecção das proteínas diferencialmente expressas foi feita por *label free* e sua abundância foi calculada com base na intensidade dos espectros correspondentes aos peptídeos. A tabela contendo todas as proteínas diferencialmente expressas encontra-se no Anexo 3. As concentrações absolutas das proteínas foram determinadas pelo método “*Proteomic ruler*”, sendo representadas em mol/g de proteína total (Wisniewski *et al.*, 2014). A determinação precisa da quantidade de DNA em uma amostra proteômica auxilia a determinação direta do número de células. O sinal de MS derivado das histonas pode ser usado como padrão de todo o conjunto de dados do proteoma (Wisniewski *et al.*, 2014). Nas células eucarióticas o DNA é compactado na forma de cromatina pelas histonas, e a massa de DNA total é praticamente igual à massa combinada de todos os tipos de histonas. Deste modo, na “*Proteomic ruler*” a soma das intensidades dos espectros das histonas equivale à quantidade total de DNA na célula, através da qual é possível determinar o número de células (Wisniewski *et al.*, 2014). A Tabela 5 contém algumas proteínas diferencialmente expressas nas duas condições como, por exemplo, as proteínas “iron/zinc transporter protein [LIT1]” e “Putative ferric reductase [LFR1]” que tiveram suas expressões aumentadas em 7,6 e 16 vezes em meio depletado de ferro, confirmando os resultados observados por qPCR na presente tese (Tabela 5). Diversas subunidades da enzima citocromo C oxidase (Complexo IV) apresentaram diminuição de aproximadamente 1,7 vezes em suas expressões corroborando os resultados obtidos por qPCR e por atividade enzimática (Tabela 5). Além disso, observou-se que várias peptidases são diferencialmente expressas em meio depletado de ferro sugerindo que o metal pode ter papel importante na regulação destas

proteínas. A tabela completa contendo as proteínas diferencialmente expressas encontra-se no anexo 8.2.

Tabela 5. Proteínas de que sofreram aumento ou redução em sua expressão em meio depletado de ferro segundo o método MED-FASP LC-MS/MS. A tabela completa encontra-se no anexo 8.2. Os promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram cultivados na ausência ou na presença de 100 µM do quelante de ferro DIP por 24 h.

ID	Nome	DIP/Controle	Expressão na ausência de DIP (Controle)	Expressão na presença de DIP
A4H630	GP63-3 protein (EC 3.4.24.36)	1,75947	-	+
A4H635	GP63-4 protein (EC 3.4.24.36)	3,463581	-	+
A4H638	GP63, leishmanolysin (EC 3.4.24.36)	0,647672	+	-
A4H6I8	Putative aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	1,481055	-	+
A4H6Y0	Cytochrome c oxidase subunit IV (EC 1.9.3.1)	0,648237	+	-
A4H716	Putative carboxypeptidase	1,421684	-	+
A4HC35	Putative cytochrome c oxidase subunit VI	0,528626	+	-
A4HCQ2	Putative cytochrome c oxidase subunit 10 (EC 1.9.3.1)	0,580904	+	-
A4HD57	Cytochrome c oxidase subunit V (EC 1.9.3.1)	0,537544	+	-
A4HE57	Putative cytochrome c oxidase VII (EC 1.9.3.1)	0,51495	+	-
A4HH90	Cysteine peptidase C (CPC) (EC 3.4.22.-)	1,790675	-	+
A4HIA6	Putative ferric reductase [LFR1]	16,44913	-	+
A4HJD8	Putative cytochrome c oxidase VIII (COX VIII) (EC 1.9.3.1)	0,563499	+	-
A4HJV0	Iron/zinc transporter protein-like protein [LIT1]	7,439754	-	+

ID - identificação da proteína; **Nome** - Nome da proteína; **DIP/ Controle** - razão entre a concentração absoluta da proteína nos parasitos cultivados na ausência do quelante (controle) sobre a concentração absoluta da proteína nos parasitos cultivados na presença do DIP. Os valores menores que 1 indicam proteínas mais expressas por parasitos cultivados na ausência de DIP (controle) enquanto os valores maiores que 1 indicam proteínas mais expressas por parasitos cultivados em meio depletado de ferro.

4.3. Avaliação da interação de *L. (V.) braziliensis* com matrizes de colágeno do tipo 3D

Neste bloco de resultados foram demonstrados (i) a interação de *L. (V.) braziliensis* com as matrizes de colágeno por microscopia de varredura e (ii) o perfil de proteínas e peptidases secretadas por *L. (V.) braziliensis* durante a interação com matrizes de colágeno.

4.3.1. Análise por microscopia de varredura da interação de isolados de *L. (V.) braziliensis* durante a invasão de matrizes de colágeno 3D

Com o objetivo de mimetizar o interstício celular, as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram depositadas sobre a matriz 3D já polimerizada. Após 6 h de incubação, a matriz foi fixada e preparada para a microscopia eletrônica de varredura. Foi possível observar que os promastigotas interagem com as fibras de colágeno através de vários pontos de contato tanto do corpo celular quanto do flagelo (Figura 25).

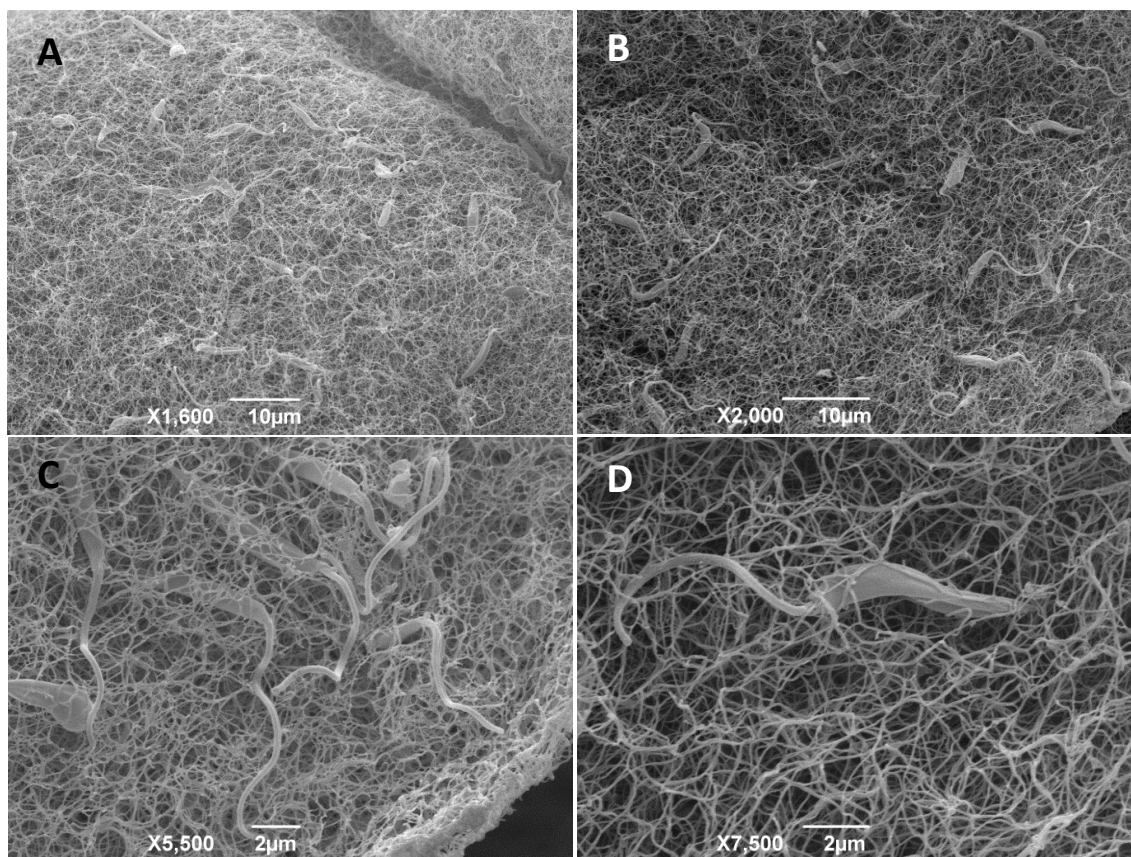


Figura 25. Microscopia eletrônica de varredura da invasão de matrizes sintéticas de colágeno por *L. (V.) braziliensis*. (A) e (B) Visão geral da interação entre os promastigotas e as fibras de colágeno. (C) Detalhe de um grupo de promastigotas invadindo a matriz de colágeno. (D) Detalhe de um promastigota interagindo com a matriz através do flagelo e do corpo celular.

4.3.2. Identificação das proteínas secretadas por *L. (V.) braziliensis* durante a invasão de matrizes de colágeno 3D

As secreções dos ensaios de invasão das matrizes 3D foram processadas para análise por LC-MS/MS. As secreções dos promastigotas em meio RPMI foram utilizadas como controle do ensaio, verificando-se assim a influência da interação com a matriz de colágeno no perfil de proteínas secretadas. Após 6 h de incubação as secreções foram concentradas por centrifugação e separadas por SDS-PAGE 12%. Nas duas amostras foram observadas proteínas com massas moleculares entre 17 e 225 kDa. Após a coloração os géis foram divididos em 8 seções as quais foram processadas para análise por espectrometria de massas segundo a Figura 26. Na secreção em meio RPMI foram identificados 646 peptídeos correspondentes a 190 proteínas (Anexo 8.3). Por outro lado, durante a interação com as matrizes de colágeno, foram identificados 437 peptídeos correspondentes a 141 proteínas (Anexo 8.4). Foram identificadas diversas peptidases nas duas amostras analisadas, dentre elas algumas aminopeptidases, carboxipeptidases, cisteína-peptidases e metalopeptidases.

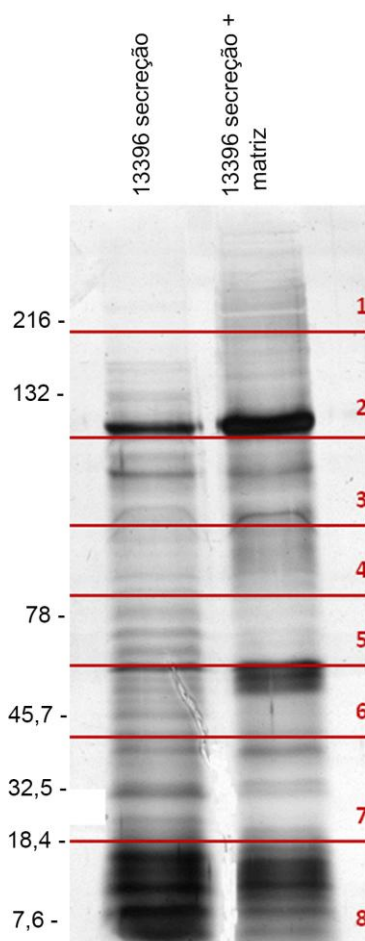


Figura 26. Separação das proteínas secretadas por *L. (V.) braziliensis* em meio de cultura e durante a invasão de matrizes de colágeno 3D. As proteínas foram separadas em gel de SDS-PAGE e as bandas foram recortadas em oito seções posteriormente descoradas, reduzidas, alquiladas e digeridas. Os peptídeos resultantes foram analisados por LC-MS/MS.

4.3.3. Classificação funcional das proteínas secretadas por *L. (V.) braziliensis* em meio de cultura ou durante a invasão de matrizes de colágeno 3D

As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com seu processo biológico e função molecular segundo os termos de ontologia gênica depositados para cada proteína na base de dados UniProt. Foi utilizado o módulo Gene Ontology Explorer (GOEx) para essas análises. Na secreção em meio RPMI foram identificadas 190 proteínas das quais 179 possuem função molecular conhecida (Figura 27 A) enquanto 168 têm processo biológico

designado (Figura 27 B). Quanto à função molecular, as proteínas mais abundantes foram associadas com ligação (38%), atividade de hidrolase (23%) e atividade catalítica (19%). Com respeito ao processo biológico, as proteínas mais abundantes foram relacionadas com atividade catalítica (55%), processo biossintético (21%) e processo catabólico (12%).

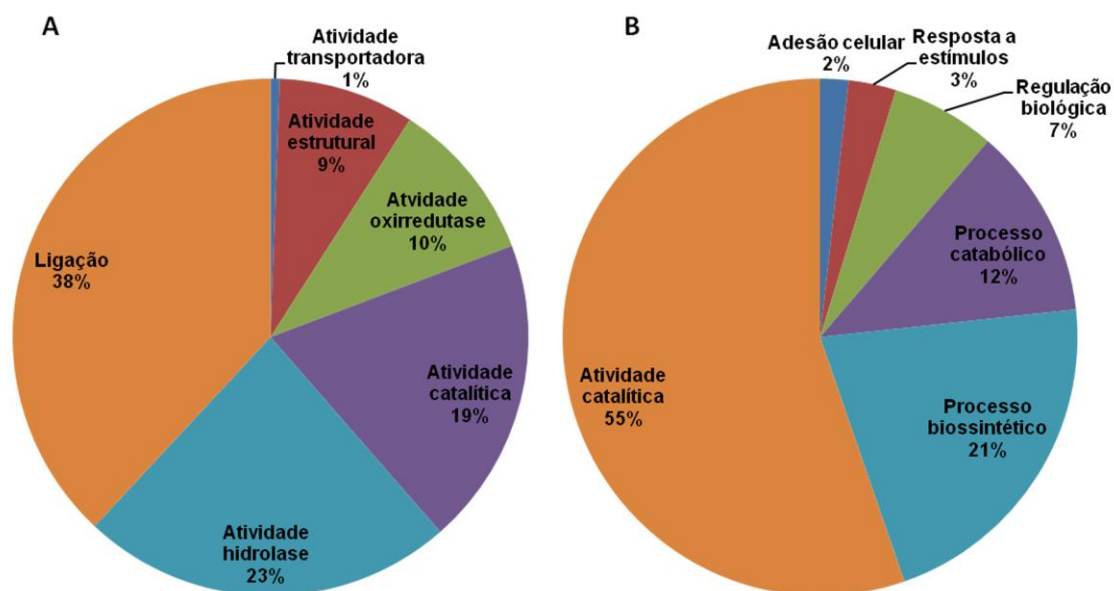


Figura 27. Classificação funcional das proteínas identificadas na secreção de *L. (V.) braziliensis* em meio RPMI segundo o Gene Ontology. (A) Função Molecular (B) Processo Biológico.

Na secreção coletada após a interação com as matrizes 3D foram identificadas 141 proteínas das quais 136 possuem função molecular conhecida (Figura 28 A) enquanto 124 possuem processo biológico designado (Figura 28 B). Com respeito à função molecular, as proteínas mais abundantes também estavam envolvidas com ligação (34%), atividade de hidrolase (31%) e atividade catalítica (18%). Com relação ao processo biológico, as proteínas mais abundantes foram novamente associadas com atividade catalítica (63%), processo biossintético (14%) e processo catabólico (13%).

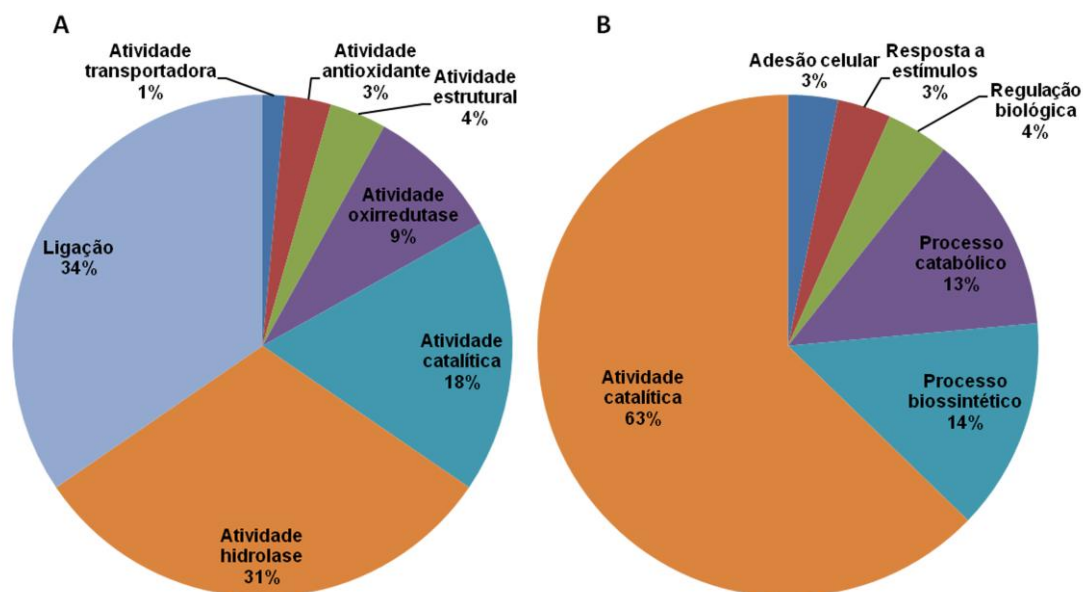


Figura 28. Classificação funcional das proteínas identificadas na secreção de *L. (V.) braziliensis* durante a interação com as matrizes 3D segundo o Gene Ontology. (A) Função Molecular (B) Processo Biológico.

4.3.4. Análise enzimográfica da secreção de *L. (V.) braziliensis* durante a invasão de matrizes de colágeno 3D

Para verificar a influência da interação com matrizes de colágeno no perfil proteolítico de *L. (V.) braziliensis*, a secreção dos parasitos foi coletada após 6 h de incubação em meio RPMI (controle) ou em meio RPMI durante a invasão de matrizes de colágeno 3D. Em seguida, foram submetidas à separação por enzimografia em gel de SDS-PAGE copolimerizado com gelatina. Observou-se que o perfil enzimático exibido durante a invasão da matriz é idêntico ao apresentado pelo controle (Figura 29). Ambos são constituídos por três bandas de atividade enzimática com massas moleculares aproximadas de 125, 103,7 e 84,7 kDa. As três bandas de degradação proteolítica foram fortemente inibidas por 10 mM de 1,10-fenantrolina (FEN) sendo formadas pela atividade de metalopeptidases (Figura 29).

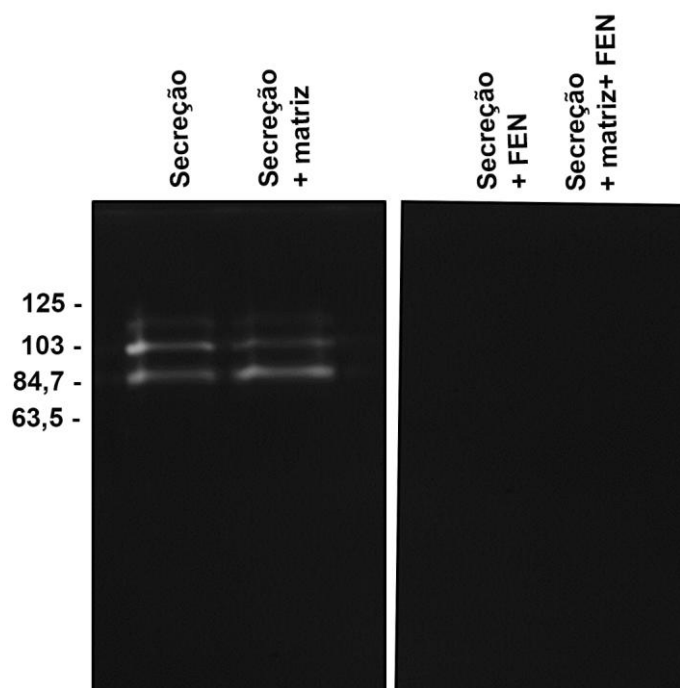


Figura 29. Separação das peptidases secretadas por *L. (V.) braziliensis* em meio de cultura e durante a invasão de matrizes de colágeno 3D. As peptidases foram separadas em gel de SDS-PAGE copolimerizado com gelatina. As bandas de atividade proteolítica foram descoradas, reduzidas, alquiladas e digeridas. Os peptídeos resultantes foram analisados por LC-MS/MS.

4.3.5. Identificação das peptidases secretadas por *L. (V.) braziliensis* durante a invasão de matrizes de colágeno 3D

Após a realização do ensaio enzimográfico, as três bandas de atividade proteolítica foram extraídas do gel e processadas para análise por LC-MS/MS. Quatro peptidases foram identificadas diretamente no gel de enzimografia (Tabela 6). Uma delas, identificada nas bandas 1 e 2 (125 e 103,7 kDa) possui atividade de metalopeptidase segundo a classificação funcional do Gene Ontology podendo ser responsável pela degradação da gelatina no gel enzimográfico.

Tabela 6. Peptidases identificadas diretamente nas bandas de degradação proteolítica em gel enzimográfico. Após o ensaio de invasão das matrizes de colágeno 3D, a secreção dos promastigotas foi coletada e submetida à separação por enzimografia em gel de SDS-PAGE copolimerizado com gelatina. As três bandas de atividade proteolítica foram extraídas, descoradas, reduzidas, alquiladas e digeridas. Os peptídeos foram identificados por espectrometria de massas (LC-MS/MS) usando a base de dados não redundante do NCBI.

ID	PI	NA	MM	NP	NS	C	D	B	F
A4HF12	KTPETAQVFVDELIPK.V K.GVPESVLSGLPR.T	607	68606,3	2	4	0,04	Complete genome, chromosome 26 OS=Leishmania braziliensis GN=LBRM_26_1590 PE=3 SV=1	1 e 2	metalloendopeptidase activity
A4HE26	KVSCVAAHVLLVGALGQLR.D KSVCAAELEAICTSVQLCQR.L	538	57013,1	2	2	0,07	Aminopeptidase, putative OS=Leishmania panamensis GN=LPMP_110650 PE=4 SV=1	3	metalloexopeptidase activity
A4H4D9	RAGLVGLEFYTPEK.H KLLLENSDGTFFNFDK.N KVDGPTVETNIGFIESYR.D REFAGSVEGVVDSFVTR.H RQAIGDLLVNLNVNK.A RFCILQALVR.A	679	76020,6	6	6	0,12	Complete genome, chromosome 5 OS=Leishmania braziliensis GN=LBRM_05_0940 PE=4 SV=1	2	dipeptidyl-peptidase activity
A4HQJ7	KIDLPGVTVTSLFASYK.K	697	78266,9	1	1	0,02	Complete genome, chromosome 36 OS=Leishmania braziliensis GN=LBRM_35_7100 PE=4 SV=2	1	serine-type endopeptidase activity

ID: código da proteína no UNIPROT; **PI:** peptídeos identificados; **NA:** número de aminoácidos; **MM:** massa molecular em daltons (Da); **NP:** número de peptídeos identificados; **NS:** número de espectros correspondentes aos peptídeos; **C:** cobertura; **D:** descrição; **B:** bandas; **F:** função. **Banda 1** (125 kDa), **Banda 2** (103,7 kDa) e **Banda 3** (84,7 kDa)

5. DISCUSSÃO

O ferro é um elemento essencial para a sobrevivência, proliferação e diferenciação de diversos microorganismos. O metal exerce um papel crítico nas relações parasito-hospedeiro e atua como cofator de enzimas cruciais tais como ribonucleotídeo redutase, aconitase e enzimas envolvidas na transferência de elétrons e no metabolismo de carboidratos e oxigênio (Wilson e Britingan, 1998). Os quelantes de ferro têm sido utilizados para simular ambientes depletados do metal e avaliar as alterações sofridas pelos distintos tipos celulares diante do estresse nutricional. O efeito da depleção de ferro induzida por quelantes tem sido estudado em diversos protozoários parasitos tais como *L. (L.) chagasi* (Soteriadou *et al.*, 1995), *P. falciparum* (Atkinson *et al.*, 1991), *T. cruzi* (Loo e Lalonde, 1984), *T. brucei* (Merschjohann e Steverding, 2006), *T. vaginalis* (Lehker *et al.* 1991; De Jesus *et al.*, 2007), *T. foetus* (Melo-Braga *et al.*, 2003; De Jesus *et al.*, 2006) e *E. histolytica* (Lee *et al.*, 2008). Na presente tese o quelante de ferro DIP foi utilizado para avaliar os efeitos da depleção de ferro sobre a proliferação, a ultraestrutura e a expressão proteica das formas promastigotas *L. (V.) braziliensis*.

A proliferação e a viabilidade dos promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram reduzidas pelo quelante DIP de forma dose e tempo dependente. Após 24 h de exposição a 100 µM do quelante a proliferação foi completamente inibida. Nesta concentração, os promastigotas apresentaram perda completa da viabilidade celular após 3 dias de cultivo. A quelação do ferro citosólico livre e daquele complexado às enzimas que dependem do metal para sua atividade, como aquelas envolvidas na síntese de DNA, podem acarretar na inibição da proliferação dos promastigotas de *L.(V.) braziliensis*. Em um estudo anterior foi demonstrado que o quelante de ferro quercetina reduz a atividade da enzima ribonucleotídeo redutase inibindo a proliferação de formas amastigotas de *L. (L.) donovani in vivo* (Sen *et al.*, 2008). A diminuição da atividade da ribonucleotídeo redutase também foi observada após o tratamento de células tumorais com outros quelantes de ferro (revisada por Le e Richardson, 2002). A enzima ribonucleotídeo redutase é essencial para a síntese do DNA sendo constituída por duas subunidades proteicas, denominadas R1 e R2. A subunidade R1 contém o sítio catalítico responsável pela redução de

ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos. A subunidade R2 possui um radical tirosil que necessita de ferro para permanecer estável. Na ausência de um fornecimento constante de ferro para R2, a subunidade R1 permanece inativa interrompendo a divisão celular (Le e Richardson, 2002). A inibição do crescimento e a redução na viabilidade dos parasitos também podem estar relacionadas com a diminuição da disponibilidade de protoporfirina IX requerida para a síntese dos anéis tetrapirrólicos que constituem o heme. Como mencionado anteriormente, os protozoários do gênero *Leishmania* não possuem todas as enzimas necessárias para a síntese do grupamento heme, necessitando adquirir protoporfirina IX ou heme exógenos para permanecerem viáveis (Chang *et al.*, 1985; Koreny *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2011). Em estudos anteriores foi observado que a inibição de hemeoproteínas mitocondriais como os complexos II, III e IV da cadeia de transporte de elétrons acarreta na interrupção da proliferação celular em *Leishmania*. Também foram observados danos diretos à mitocôndria tais como despolarização do $\Delta\psi_m$, redução do consumo de oxigênio e aumento da sensibilidade às ROS (Mehta e Shaha, 2004; Luque-Ortega e Rivas, 2007; Carvalho *et al.*, 2010). O uso de inibidores e a deleção alélica dos citocromos B5 (CYB5) e P450 (CYP450), localizados no retículo endoplasmático, também inibiu o crescimento das formas promastigotas de diversas espécies do parasito. Ademais, a despolarização do $\Delta\psi_m$ e o desacoplamento da fosforilação oxidativa também foram observados nestas condições (Verma *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2012). No presente estudo observou-se uma redução significativa na concentração intracelular de ferro após 24 e 48 h cultivo na presença de 100 μM de DIP. Também se verificou uma diminuição da concentração de ferro extracelular após 24 h de cultivo na mesma condição. Embora a redução nas concentrações intracelulares e extracelulares de heme não tenham sido estatisticamente significativas é possível que pequenas alterações sejam biologicamente importantes reduzindo a disponibilidade de heme para a formação de proteínas da cadeia de transporte de elétrons. Como o heme também é um quelante de ferro, não se pode descartar que ele tenha mais afinidade pelo metal do que o DIP. Neste caso as concentrações intra e extracelulares de heme não seriam reduzidas pelo tratamento, mas a síntese de novos grupamentos heme a partir da protoporfirina IX poderiam ser afetadas. Sendo assim, é provável que a

quelação de ferro pelo DIP reduza a disponibilidade do metal necessária para a formação das hemeoproteínas. O sequestro do ferro pelo quelante também pode diminuir a concentração do metal requerida para a síntese de proteínas Fe-S nas quais o ferro não está presente no heme, mas encontra-se em associação com átomos de enxofre inorgânico ou com aqueles presentes nos resíduos Cys da proteína. Estes mecanismos, em conjunto, provavelmente afetam o transporte de elétrons através da cadeia respiratória e acarretam na interrupção do crescimento e na perda da viabilidade dos parasitos. Outra evidência para esta hipótese é a redução da expressão (aos níveis de RNA_m e proteína) e da atividade da enzima citocromo C oxidase, registrada por distintas técnicas neste estudo.

A depleção de ferro induz a disfunção mitocondrial em diversos tipos celulares. A análise ultraestrutural de linfócitos, macrófagos e células reticulares do baço de coelhos após alimentação com dieta pobre em ferro revelou aumento do volume das mitocôndrias bem como desintegração da crista e da matriz mitocondrial (Rodvien *et al.*, 1974). Resultados semelhantes foram observados em linfócitos do sangue periférico de humanos anêmicos (Jarvis e Jacobs, 1974). No presente estudo, a mitocôndria de *L. (V.) braziliensis* cultivada em meio depletado de ferro sofreu aumento de volume e perda da membrana interna além de apresentar redução da elétron-densidade da matriz e intensa vacuolização. Ademais, a incubação das formas promastigotas com TMRE e posterior análise por citometria de fluxo revelou que o tratamento com o quelante reduziu o $\Delta\psi_m$ de forma dose dependente. Diversos mecanismos podem ser associados ao dano mitocondrial em ambiente depletado de ferro. Em um estudo conduzido com células hepáticas da linhagem Chang, a expressão da subunidade Fe-S do complexo II foi drasticamente reduzida após tratamento com o quelante DFO (Yoon *et al.*, 2003). No mesmo estudo, a dissipação do $\Delta\psi_m$ e a redução da síntese de ATP foram relacionadas com a diminuição da atividade do complexo II em meio depletado de ferro (Yoon *et al.*, 2003). Em *Leishmania*, a inibição dos complexos enzimáticos II, III e IV também acarretou na redução da síntese de ATP e na dissipação do $\Delta\psi_m$ (Mehta e Shaha, 2004; Luque-Ortega e Rivas, 2007; Carvalho *et al.*, 2010). Condições de estresse tais como a redução da

síntese de ATP, podem elevar a concentração de íons Ca^{+2} na mitocôndria, acarretando na dissipação do $\Delta\psi_m$. Em alguns casos, pode haver abertura do poro de transição de permeabilidade entre as membranas externa e interna da mitocôndria. Este evento potencializa a dissipação do $\Delta\psi_m$ através da quebra da homeostase do cálcio (Wallace, 1999; Ly *et al.*, 2003). Em *L. (L.) donovani*, a inibição do complexo II reduziu a síntese de ATP, elevou a concentração de cálcio intracelular e, conseqüentemente, dissipou o $\Delta\psi_m$ (Mehta e Shaha, 2004). Na presente tese, os promastigotas cultivados por 24 h na presença de 100 μM do quelante DIP apresentaram cerca de 60% de redução no consumo de oxigênio. O complexo IV, que é responsável por carrear elétrons do citocromo C para o oxigênio molecular, também apresentou redução tanto na expressão proteica quanto na atividade enzimática em meio depletado de ferro. Embora não seja possível relacionar o consumo de oxigênio e a síntese de ATP de forma direta, os dois resultados descritos acima sugerem que a privação de ferro induz uma redução na síntese de ATP por *L. (V.) braziliensis*, o que pode ocasionar o inchaço mitocondrial e a dissipação do $\Delta\psi_m$.

A disfunção mitocondrial em ambiente depletado de ferro também tem sido associada com o acúmulo de ROS na mitocôndria dos parasitos. Um estudo anterior demonstrou que a anemia causada por deficiência de ferro em modelo murino resultou em um aumento do estresse oxidativo nas hemácias dos animais (Nagababu *et al.*, 2008). Em outro trabalho, a alimentação de ratos com dieta pobre em ferro acarretou no desacoplamento mitocondrial e no aumento da quantidade de O_2^- produzido pela organela (Walter *et al.*, 2002). Como mencionado anteriormente, as ROS atuam como moléculas sinalizadoras de eventos como crescimento e diferenciação celular. No entanto, ineficiências no transporte de elétrons desencadeadas pelo dano aos componentes da cadeia respiratória acarretam em uma maior produção de ROS pela mitocôndria (Mitra *et al.*, 2013). Nas formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* a expressão e a atividade do complexo II são maiores do que nas formas epimastigotas, facilitando a entrada de elétrons na cadeia de transporte daquelas formas evolutivas (Gonçalves *et al.*, 2011). Por outro lado, a expressão e a atividade dos complexos III e IV são menores nos tripomastigotas, restringindo a conversão do O_2 em H_2O e aumentando o

vazamento de elétrons que se combinam com o oxigênio livre para gerar O_2^- e H_2O_2 (Gonçalves *et al.*, 2011). Embora os níveis de ROS não tenham sido mensurados no presente estudo, as reduções observadas na expressão e na atividade do complexo IV sugerem que a depleção de ferro gera um estresse oxidativo devido ao vazamento de elétrons na etapa final da cadeia de transporte. Como possíveis consequências do vazamento de elétrons e da formação de ROS observam-se a redução do consumo de oxigênio e a despolarização do $\Delta\psi_m$ nos parasitos cultivados na presença do quelante.

A sequência de eventos descrita acima pode caracterizar um possível mecanismo de ação do quelante de ferro DIP sobre as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. No entanto, é provável que alguns parasitos não sofram destes efeitos. Foi observado que após 48 h de incubação com DIP os promastigotas demonstraram uma recuperação parcial do $\Delta\psi_m$. Este resultado sugere que durante o tratamento com o quelante alguns parasitos apresentaram redução do crescimento e morreram, enquanto outros se adaptaram e sobreviveram por pelo menos 48 h. Esta hipótese é reforçada pela observação de que os parasitos tratados com DIP foram capazes de recuperar sua proliferação após reinoculação em meio de cultura fresco na ausência do quelante. Além disso, as marcações com TUNEL e PI demonstraram que os parasitos tratados durante 24 ou 48 h com o quelante de ferro não sofreram fragmentação do DNA nuclear ou permeabilização da membrana celular. A sobrevivência de *L. (V.) braziliensis* em meio depletado de ferro poderia ser justificada pelo aumento da captação do metal a partir do meio extracelular através de transportadores. Foi demonstrado que após 24 h de cultivo em meio depletado de ferro formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* aumentaram em seis vezes o nível de expressão do RNAm do transportador de ferro LIT1 (Mitra *et al.*, 2013). Ademais, a expressão do RNAm do transportador de heme LHR1 apresentou aumento de quatro vezes em promastigotas cultivadas por 15 h na ausência de hemina (Huynh *et al.*, 2012). O aumento da expressão dos transportadores foi seguido por uma elevação nas concentrações intracelulares de ferro e heme, garantindo a sobrevivência e a viabilidade dos parasitos (Huynh *et al.*, 2012; Mitra *et al.*, 2013). No presente estudo foram observados aumentos na expressão do RNAm de LIT1 e LHR1 após 24 e 48 h de cultivo

em meio depletado de ferro indicando que a privação do metal também regula positivamente a expressão destes transportadores em *L. (V.) braziliensis*. A concentração de ferro intracelular dos parasitos cultivados na presença de 50 μM de DIP apresentou aumento após 48 h de cultivo, igualando-se ao controle. Por outro lado, os promastigotas cultivados na presença de 100 μM do quelante mantiveram a mesma concentração de ferro intracelular após 48 h de cultivo. A concentração de heme intracelular também foi mantida após o cultivo na presença de 100 μM de DIP. Estes resultados indicam que os aumentos nas expressões de LIT1 e LHR1 provavelmente compensam o efeito do quelante, aumentando ou mantendo as concentrações intracelulares de ferro e heme necessárias para a sobrevivência dos parasitos após 48 h de cultivo. Em *L. (L.) amazonensis* a elevação da expressão do LIT1 e da concentração intracelular de ferro acarretou no aumento da atividade da enzima FeSOD que, em tripanossomatídeos, utiliza o ferro como seu único cofator e catalisa a reação de dismutação do O_2^- em H_2O_2 (Mittra *et al.*, 2013). Nesta espécie de *Leishmania*, o H_2O_2 produzido em meio depletado de ferro induziu a diferenciação dos promastigotas em amastigotas capazes de causar lesões cutâneas em camundongos (Mittra *et al.*, 2013). Por outro lado, os promastigotas $\Delta lit1$ foram incapazes captar ferro ou aumentar a atividade da FeSOD sendo levados à morte devido ao acúmulo intracelular de O_2^- (Mittra *et al.*, 2013). No presente estudo, a depleção de ferro induziu um aumento na expressão do RNAm da enzima FeSOD de *L. (V.) braziliensis* após 24 e 48 h de cultivo. Embora experimentos adicionais sejam necessários, é possível sugerir que os promastigotas utilizem esse mecanismo para reduzir sua concentração intracelular de O_2^- e prorrogar sua sobrevivência. Estes resultados são consistentes com as considerações feitas acima, indicando que alguns promastigotas morrem devido à depleção de ferro, enquanto outros podem se adaptar ao estresse nutricional e sobreviver. Ademais, embora o quelante DIP possa ser tóxico para os parasitos que morrem, o mecanismo envolvido na citotoxicidade deste composto para *L. (V.) braziliensis* seria distinto daquele proposto na literatura, que envolve a clivagem do DNA nuclear (Li *et al.*, 2004).

A inibição da proliferação e as alterações ultraestruturais sofridas pelos promastigotas de *L. (V.) braziliensis* cultivados em meio depletado de ferro foram acompanhadas por mudanças na expressão de proteínas. A análise por eletroforese 2D e MALDI-MS/MS identificou nove proteínas diferencialmente expressas por parasitos cultivados na presença de 100 μ M de DIP por 24 h. De acordo com a classificação funcional obtida a partir dos termos de ontologia gênica, três proteínas [“Chain A eukaryotic initiation factor 5A” (com três distintas isoformas identificadas), “60S acid ribosomal protein P2”, “ribonucleoprotein p18 mitochondrial precursor”] estão envolvidas no metabolismo de ácidos nucleicos, especificamente na união à RNA e na elongação durante a tradução. A diminuição na expressão destas proteínas pode estar associada à inibição da multiplicação dos parasitos em meio depletado de ferro. Por outro lado, a redução da expressão de proteínas localizadas na mitocôndria tais como “ribonucleoprotein p18 mitochondrial precursor” e “cytochrome C oxidase subunit V” pode estar relacionada com o dano ultraestrutural apresentado por esta organela. É importante ressaltar que a redução na expressão e na atividade da proteína citocromo C oxidase (complexo IV) foi detectada por várias técnicas durante presente tese, demonstrando que esta proteína é diretamente afetada pela disfunção mitocondrial causada pela depleção de ferro. As proteínas “ubiquitin conjugated enzyme E2” e “ubiquitin conjugating enzyme-like”, também apresentaram diminuição na expressão após o tratamento com o quelante. Estas proteínas participam em processos biológicos de modificação pós-traducional de outras proteínas, especificamente na via de degradação proteossomal. A ubiquitinação múltipla resulta na marcação do alvo por uma poliubiquitina o que pode levar à degradação proteolítica pelo proteossoma 26 S (Livnat-Levanon e Glickman, 2011; Shang e Taylor, 2011). A diminuição na expressão destas enzimas pode estar associada à redução do metabolismo geral dos promastigotas submetidos à privação de ferro. No entanto, o papel da depleção de ferro na regulação destas proteínas ainda precisa ser esclarecido. Duas proteínas hipotéticas tiveram sua expressão diminuída nos promastigotas cultivados em meio depletado de ferro. Nenhuma função pôde ser atribuída à proteína XP_001467133 pelas bases de dados consultadas. Por outro lado, a proteína hipotética XP_001563170 contém domínios característicos da família

ALBA. As proteínas da família ALBA se ligam ao DNA de dupla fita, RNAr e RNAm e podem ter um papel na manutenção da estabilidade estrutural e funcional do RNA e dos ribossomos. Em tripanossomatídeos próximos a *L. (V.) braziliensis*, foi recentemente demonstrado que proteínas com domínios ALBA se localizam no citoplasma e são recrutadas para “grânulos de estresse” durante condições de privação nutricional. Estas proteínas regulam o desenvolvimento de *T. brucei* no inseto vetor e participam do processo de diferenciação do parasito (Subota *et al.*, 2011). Ademais, a redução na expressão destas proteínas reduz a iniciação da tradução proteica e produz um fenótipo de crescimento lento nos parasitos (Mani *et al.*, 2011). Deste modo, a diminuição da expressão da proteína hipotética XP 001563170, que contém domínios ALBA, está de acordo com a redução geral da síntese proteica que ocorreu nos parasitos cultivados na presença do quelante. A calmodulina funciona como um sensor de cálcio localizado no axonema e está intimamente associada com motilidade ciliar e com processos de sinalização celular nos eucariotos (DiPetrillo e Smith, 2010). Em *T. brucei*, a diminuição da expressão desta proteína acarreta na interrupção do crescimento e na perda da viabilidade celular (Eid e Sollner-Webb, 1991). Também nesta espécie, foi demonstrada a localização da calmodulina no flagelo e seu possível papel na movimentação dos microtúbulos do axonema durante o ciclo de batimento flagelar do parasito (Lee *et al.*, 1990; Ridgley *et al.*, 2000; Portman *et al.*, 2009). Alguns estudos demonstraram que a reciclagem do receptor de transferrina para a superfície celular e a exocitose de transferrina (Grasso *et al.*, 1990) são eventos dependentes de calmodulina, demonstrando uma relação direta entre a homeostase do ferro e a expressão desta proteína. Deste modo, a diminuição da expressão da calmodulina em meio depletado de ferro pode ter contribuído para a perda da motilidade, da viabilidade e da homeostase do ferro em *L. (V.) braziliensis*. Os níveis de RNAm das proteínas diferencialmente expressas foram analisados por qPCR e não foram observadas diferenças significativas entre os parasitos cultivados na ausência e na presença de 100 μ M de DIP por 24 h. Estes resultados confirmam estudos anteriores que demonstraram que nem sempre existe correlação entre os níveis de RNAm e proteína em parasitos do gênero *Leishmania* (McNicoll *et al.*, 2006; Haile *et al.*, 2008). No entanto, a baixa sensibilidade da eletroforese 2D com relação ao qPCR

também pode ter contribuído para a falta de correlação entre os resultados dos dois ensaios. De acordo com esta hipótese, foi observada correlação entre a expressão de algumas proteínas identificadas por LC-MS/MS em Q Exactive e a expressão dos genes que codificam estas proteínas por qPCR.

Com a finalidade de ampliar a análise do efeito da depleção de ferro sobre a expressão proteica dos parasitos, as proteínas foram processadas segundo o método MED-FASP e analisadas por LC-MS/MS. Foram identificadas 647 proteínas diferencialmente expressas, dentre elas diversas subunidades da enzima citocromo C oxidase (complexo IV) que apresentaram redução da expressão em meio depletado de ferro, confirmando os resultados obtidos por outras metodologias. Também foram identificadas as proteínas “Putative ferric reductase” e “Iron/zinc transporter protein like” que tiveram sua expressão aumentada em meio depletado de ferro. Estas proteínas correspondem à enzima LFR1 e ao transportador LIT1 que são responsáveis pelo aumento da captação de ferro em meio depletado do metal. O aumento da expressão da “Iron/zinc transporter protein like” confirma ao nível de proteína o aumento na expressão do LIT1 observado ao nível de RNAm constituindo um importante achado deste estudo.

Diversas peptidases também apresentaram expressão diferencial nos parasitos cultivados na ausência e na presença de 100 μ M do quelante DIP. Embora os resultados obtidos através da análise por MED-FASP e LC-MS/MS sejam referentes aos extratos proteicos, é possível sugerir que o ferro poderia desempenhar um papel importante na regulação de peptidases em *L. (V.) braziliensis*. No presente estudo, os ensaios de invasão das matrizes de colágeno foram realizados durante 6 h na ausência do quelante. Os resultados demonstraram que os promastigotas estabeleceram contato com as matrizes através de vários pontos do flagelo e do corpo celular. Neste tempo de interação não foram observadas modificações à estrutura das fibras de colágeno. No entanto, após 24 h de interação, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram capazes de degradar e remodelar as matrizes (Cabral, 2011; Petropolis *et al.*, 2014). A degradação das matrizes nesta condição provavelmente se deve ao maior tempo de exposição à ação mecânica e aos produtos de secreção dos parasitos. As proteínas e peptidases

secretadas pelos promastigotas foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por LC-MS/MS. Várias peptidases pertencentes às classes das cisteína-peptidases e das metalopeptidases foram identificadas por LC-MS/MS na secreção dos parasitos durante a interação com as matrizes de colágeno. Muitas destas enzimas também foram identificadas na secreção em meio condicionado, sugerindo que elas podem ser constitutivamente expressas pelos parasitos. Contudo, não se pode descartar a existência de diferenças quantitativas nos níveis de expressão proteica, que não puderam ser verificadas através da metodologia utilizada. As peptidases secretadas pelos parasitos durante a invasão das matrizes também foram analisadas por enzimografia. Observou-se que o perfil enzimográfico dos parasitos que secretaram na presença das matrizes de colágeno apresenta as mesmas bandas de atividade proteolítica observadas na secreção em meio RPMI e no extrato total. Estas bandas, que correspondem à atividade de metalopeptidases, já foram previamente identificadas em trabalhos do nosso grupo (Cuervo *et al.*, 2006). Além disso, o perfil proteolítico desta cepa não sofre alterações durante a interação com macrófagos murinos (Cabral, 2011). Provavelmente, os promastigotas secretam o mesmo grupo de enzimas proteolíticas nos diferentes estágios da infecção, ou seja, desde a sua inoculação na epiderme até a invasão das células hospedeiras. De acordo com esta hipótese, foi demonstrado que uma metalopeptidase de 60 kDa é capaz de se ligar e degradar, junto com a Gp63, a fibronectina da MEC (Kulkarni *et al.*, 2008). Os peptídeos resultantes dessa proteólise também estão envolvidos na inativação dos macrófagos teciduais pela modulação da produção de ROS, contribuindo para a sobrevivência do parasito na célula hospedeira (Kulkarni *et al.*, 2008). Durante a presente tese, quatro peptidases foram identificadas por LC-MS/MS diretamente do gel de enzimografia. Uma destas foi identificada nas bandas de 125 e 103,7 kDa, podendo corresponder a duas isoformas da mesma enzima ou indicar a ocorrência de modificações pós traducionais que alteraram a massa molecular da proteína. Esta peptidase possui atividade de metalopeptidase de acordo com a classificação funcional obtida a partir dos termos de ontologia gênica. Como foi identificada diretamente do halo de atividade enzimática é provável que esta seja uma das metalopeptidases ativas responsáveis pela degradação do substrato.

Durante a presente tese foram estudados a importância do ferro para *L. (V.) braziliensis* e aspectos da interação entre estes parasitos e matrizes de colágeno sintéticas. Embora a complexidade dos mecanismos regulados pelo ferro em *Leishmania* spp ainda não seja completamente compreendida, nossos resultados demonstraram que a depleção de ferro gera uma resposta multifatorial que resulta no colapso celular que se inicia pela interrupção da proliferação culminando em um acentuado comprometimento da mitocôndria. Este comprometimento é caracterizado pela diminuição da atividade do complexo IV que, provavelmente, acarreta em um vazamento de elétrons na mitocôndria induzindo a geração de ROS, a redução do consumo de oxigênio e a despolarização do $\Delta\psi_m$. Enquanto alguns parasitos morrem devido à disfunção mitocondrial outros conseguem resistir ao estresse nutricional e sobreviver. A elevação da expressão dos transportadores LIT1 e LHR1 deve estar envolvida neste mecanismo de resistência, pois possibilita o aumento ou a manutenção da concentração de ferro intracelular dos parasitos. O aumento na expressão de FeSOD, também deve desempenhar um importante papel na resistência dos parasitos à disfunção mitocondrial causada pela depleção de ferro. Finalmente, a sobrevivência dos parasitos durante a privação do metal sugere uma plasticidade ou resiliência da mitocôndria, observada em outros tripanossomatídeos sob distintas condições de cultivo (Van Hellemond *et al.*, 1998; Gonçalves *et al.*, 2011). Ainda é possível sugerir que outras vias metabólicas, tais como a glicólise, sejam reguladas positivamente durante o cultivo de *L. (V.) braziliensis* em meio depletado de ferro, compensando a diminuição da produção de energia por fosforilação oxidativa. A investigação desta hipótese é uma das perspectivas desta tese. Outra perspectiva é a análise diferencial das proteínas secretadas por *L. (V.) braziliensis* em meio condicionado e durante a interação com as matrizes de colágeno. A análise por MED-FASP poderia revelar um grande número de proteínas diferencialmente expressas nas duas condições, indicando proteínas especificamente envolvidas com o remodelamento da matriz e com o processo de sinalização celular disparado no início da infecção por *Leishmania*.

6. CONCLUSÕES

6.1. A depleção de ferro gera uma resposta multifatorial e resulta no colapso celular que se inicia pela interrupção da proliferação e culmina em um acentuado comprometimento da mitocôndria de *L. (V.) braziliensis*;

6.2. A disfunção mitocondrial gerada pela depleção de ferro acarreta na morte de parte da população de parasitos, sendo caracterizada pela diminuição da atividade do complexo IV que induz a redução do consumo de oxigênio e a despolarização do $\Delta\psi_m$;

6.3. A ausência de fragmentação do DNA nuclear ou permeabilização da membrana celular juntamente com a recuperação parcial do $\Delta\psi_m$ e a restauração do crescimento celular na ausência do quelante indicaram que alguns parasitos são capazes de sobreviver à privação do metal;

6.4. A sobrevivência de uma parcela dos promastigotas em meio depletado de ferro está relacionada com o aumento da captação do metal devido à elevação da expressão da enzima ferro redutase e dos transportadores LIT1 e LHR1;

6.5. O aumento na expressão do RNAm de FeSOD indica que a enzima poderia desempenhar um importante papel na sobrevivência dos parasitos à disfunção mitocondrial causada pela depleção de ferro, reduzindo a concentração de O_2^- na mitocôndria;

6.6. As formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* interagem com as matrizes de colágeno tanto pelo flagelo quanto pelo corpo celular, mas o remodelamento das mesmas devido à ação dos parasitos se inicia após períodos de incubação maiores que 6 h;

6.7. O perfil enzimático das secreções em meio condicionado e durante a interação com matrizes de colágeno 3D se revelou idêntico, indicando que o colágeno não modula o perfil proteolítico de *L. (V.) braziliensis*;

6.8. Uma metalopeptidase foi identificada, por espectrometria de massas, diretamente do halo de atividade enzimática sendo provável que esta seja uma

das metalopeptidases ativas secretadas por *L. (V.) braziliensis* e responsáveis pela degradação do substrato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal S, Rastogi R, Gupta D, Patel N, Raje M, Mukhopadhyay A. Clathrin-mediated hemoglobin endocytosis is essential for survival of *Leishmania*. *Biochem Biophys Acta*. 2013; 1833(5):1065-1077.

Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The Int J of Biochem and Cell Biol*. 2001; 33: 940-959.

Alderete JF, Provenzano D, Lehker MW. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microb Pathog*. 1995; 19: 93-103.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e35671.

Alves JM, Voegtly L, Matveyev AV, Lara AM, da Silva FM, Serrano MG, Buck GA, Teixeira MM, Camargo EP. Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts. *PLoS One*. 2011; 6 (8): e23518.

Antoine J, Colette J, Ryter A, Benichou JC. *Leishmania amazonensis*: acidic organelles in amastigotes. *Exp Parasitol*. 1988; 67:287–300

Arantes JM, Pedrosa ML, Martins HR, Veloso VM, de Lana M, Bahia MT, Tafuri WL, Carneiro CM. *Trypanosoma cruzi*: Treatment with iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. *Exp Parasitol*. 2007; 117: 43-50.

Atkinson CT, Bayne MT, Gordeuk VR, Brittenham GM, Aikawa M. Stage-specific ultrastructural effects of desferrioxamine on *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 45: 593-601.

Barrett AJ, Tolle DP, Rawlings ND. 2003. Managing peptidases in the genomic era. *Biol Chem* 384(6):873-882.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007; 37 (10): 1097-1106.

- Beltrán NC, Horváthová L, Jedelský PL, Sedinová M, Rada P, Marcinčíková M, Hrdý I, Tachezy J. Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. PLoS One. 2013; 31; 8(5): e65148.
- Benard G, Rossignol R. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. Antioxid Redox Signal. 2008; 10 (8):1313-1342.
- Blackwell JM, Goswami T, Evans CA, Sibthorpe D, Papo N, White JK, Searle S, Miller EN, Peacock CS, Mohammed H, Ibrahim M. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. Cell Microbiol. 2001; 3(12): 773-784.
- Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. Curr Opin Cell Biol. 2002; 14 (5): 608-616.
- Bouvier J, Schneider P, Etges R, Bordier C. 1990. Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. Biochemistry 29 (43):10113-10119.
- Breuer W, Shvartsman M, Cabantchik I. Intracellular labile iron. The Int J of Biochem and Cell Biol. 2008; 40: 350-354.
- Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. J Immunol. 1995; 15; 155 (6): 3102-3111.
- Cabral BC. Caracterização do polimorfismo proteolítico em isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e análise da interação dos parasitos com matrizes de colágeno. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Bioquímica] – UFRJ; 2011.
- Campos-Salinas J, Cabello-Donayre M, García-Hernández R, Pérez-Victoria I, Castanys S, Gamarro F, Pérez-Victoria JM. A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*. Mol Microbiol. 2011; 79(6): 1430-1444.
- Carvalho L, Luque-Ortega JR, Manzano JI, Castanys S, Rivas L, Gamarro F. Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets *Leishmania* respiratory

complex III and induces apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 5344-5351.

Carvalho S, Cruz T, Santarém N, Castro H, Costa V, Tomás AM. Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes. *Acta Trop.* 2009; 109: 131-135.

Chang C S, Chang KP. Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol* 1985; 16: 267-276.

Chaudhuri M, Ott RD, Hill GC. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol.* 2006; 22 (10): 484-491.

Cuervo P, Sabóia-Vahia L, Costa Silva-Filho F, Fernandes O, Cupolillo E, DE Jesus JB. A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Parasitology.* 2006; 132:177-185.

Cuervo P, De Jesus JB, Junqueira M, Mendonca-Lima L, González LJ, Betancourt L , Grimaldi G, Domont GB, Fernandes O, Cupolillo E. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Biochem Parasitol.* 2007; 154: 6-21.

Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia L, Mendonça-Lima L, Domont GB, Cupolillo E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *J Proteomics.* 2009; 73(1):79-92.

Cuervo P, Domont GB, De Jesus JB. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J Proteomics.* 2010; 73: 845-867.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50 (3): 296-311.

- D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Mol Cell Biol.* 2007; 8: 813-824.
- De Jesus JB, Ferreira MA, Cuervo P, Britto C, e Silva-Filho FC, Meyer-Fernandes JR. Iron modulates ecto-phosphohydrolase activities in pathogenic trichomonads. *Parasitol Int.* 2006; 55: 285-290.
- De Jesus JB, Cuervo P, Junqueira M, Britto C, Silva-Filho FC, Soares MJ, Cupolillo E, Fernandes O, Domont GB. A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics.* 2007; 7: 1961–1972.
- Denicola-Seoane A, Rubbo H, Prodanov E, Turrens JF. Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1992; 54(1): 43-50.
- De Souza W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res.* 2002; 88(12): 1013-1025.
- De Souza W, Attias M, Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(10): 2069-2080.
- DiPetrillo CG, Smith EF. Pcdp1 is a central apparatus protein that binds Ca²⁺-calmodulin and regulates ciliary motility. *J Cell Biol.* 2010; 89:601-612.
- Docampo R, Moreno SNJ. Acidocalcisomes. *Cell Calcium.* 2011; 50:113-119.
- Duboise SM, Vannier-Santos MA, Costa-Pinto D, Rivas L, Pan AA, Traub-Cseko Y, De Souza W, McMahon-Pratt D.. The biosynthesis, processing, and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinases. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 68:119–132.
- Eid JE, Sollner-Webb B. Homologous recombination in the tandem calmodulin genes of *Trypanosoma brucei* yields multiple products: compensation for deleterious deletions by gene amplification. *Genes Dev.* 1991; 11: 2024-2032.

Fang J, Beattie DS. Alternative oxidase present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide. Arch Biochem Biophys. 2003; 15; 414(2): 294-302.

Flannery AR, Huynh C, Mittra B, Mortara RA, Andrews NW. LFR1 Ferric Iron Reductase of *Leishmania amazonensis* is essential for the generation of infective parasite forms. The J of Biol Chem 2011; 286: 23266-23279.

Fleming MD, Trenor CC, Su MA, Foerzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC. Microcytic anemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. Nature Genet. 1997; 16: 383-386.

Francisco AF, de Abreu Vieira PM, Arantes JM, Pedrosa ML, Martins HR, Silva M, Veloso VM, de Lana M, Bahia MT, Tafuri WL, Carneiro CM. *Trypanosoma cruzi*: effect of benznidazole therapy combined with the iron chelator desferrioxamine in infected mice. Exp Parasitol. 2008; 120 (4): 314-319.

Galbraith RA, McElrath MJ. Heme binding to *Leishmania mexicana amazonensis*. Mol Biochem Parasitol. 1988 May; 29(1): 47-53.

Gonçalves RL, Barreto RF, Polycarpo CR, Gadelha FR, Castro SL, Oliveira MF. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J Bioenerg Biomembr. 2011; 43: 651-661.

González-Caballero N, Rodríguez-Vega A, Dias-Lopes G, Valenzuela JG, Ribeiro JM, Carvalho PC, Valente RH, Brazil RP, Cuervo P. Expression of the mevalonate pathway enzymes in the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sex pheromone gland demonstrated by an integrated proteomic approach. J Proteomics. 2014; 16 (96): 117-132.

Gordeuk VR, Thuma PE, Brittenham GM, Biemba G, Zulu S, Simwanza G, Kalense P, M'Hango A, Parry D, Poltera AA. Iron chelation as a chemotherapeutic strategy for falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48:193-197.

- Grasso JA, Bruno M, Yates MA, Wei L, Epstein PM. Calmodulin dependence of transferrin receptor recycling in rat reticulocytes. *Biochem J.* 1990; 266: 261-272.
- Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6: 230-250.
- Gull K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1999; 53: 629-655.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 1997; 388: 482-488.
- Haile S, Dupé A, Papadopoulou B. Deadenylation-independent stagespecific mRNA degradation in *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36: 1634-1644.
- Hernandez FR, Turrens JF. Rotenone at high concentrations inhibits NADH-fumarate reductase and the mitochondrial respiratory chain of *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; 15; 93(1):135-137.
- Huynh C, Sacks DL, Andrews NW. A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. *Journal of Exp Med.* 2006; 203: 2363-2375.
- Huynh C, Yuan X, Miguel DC, Renberg RL, Protchenko O, Philpott CC, Hamza I, Andrews NW. Heme uptake by *Leishmania amazonensis* is mediated by the transmembrane protein LHR1. *PLoS Pathog.* 2012; 8: e1002795.
- Jarvis JH, Jacobs A. Morphological abnormalities in lymphocyte mitochondria associates with iron deficiency anaemia. *J Clin Pathol.* 1974; 27: 973-979.
- Koreny L, Lukes J, Obornik M. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? *Int J Parasitol* 2010; 40: 149-156.
- Krishnamurthy G, Vikram R, Singh SB, Patel N, Agarwal S, Mukhopadhyay G, Basu SK, Mukhopadhyay A. Hemoglobin receptor in *Leishmania* is a hexokinase located in the flagellar pocket. *J Biol Chem.* 2005; 280: 5884-5891.

Kulkarni MM, Jones EA, McMaster WR, McGwire BS. Fibronectin binding and proteolytic degradation by *Leishmania* and effects on macrophage activation. *Infect Immun*. 2008; 76:1738-1747.

Lalonde RG, Holbein BE. Role of iron in *Trypanosoma cruzi* infection of mice. *J. Clin. Invest*. 1984; 73: 470-476.

Le NTV, Richardson DR. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim et Biophys Acta* 2002; 1603 : 31-46.

Lee J, Park SJ, Yong TS. Effect of iron on adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* to CHO cell monolayers. *Korean J Parasitol*. 2008; 46: 37-40.

Lee MG, Chen JF, Ho AW, D'Alesandro PA, Van der Ploeg LH. A putative flagellar Ca²⁺ - binding protein of the flagellum of trypanosomatid protozoan parasites. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18(14): 4252.

Lehker MW, Arroyo R, Alderete JF. The Regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med*. 1991; 174: 311-318.

Li S, Crooks PA, Wei X, de Leon J. Toxicity of dipyriddy compounds and related compounds. *Crit Rev Toxicol*. 2004; 34: 447-460.

Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Khamesipour A, Berg L, Akuffo H. 2008. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol*. 153(2):221-230.

Livnat-Levanon N, Glickman M H. Ubiquitin-proteasome system and mitochondria – reciprocity. *Biochim et Biophys Acta* 2011; 1809: 80-87.

Lockwood BC, North MJ, Scott KI, Bremner AF, Coombs GH. The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Mol Biochem Parasitol*. 1987; 24 (1): 89-95.

Loo VG, Lalonde RG. Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Infect and Immun*. 1984; 45: 726-730.

Lu H-G, Zhong L, Chang KP, Docampo R. Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling, and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis*. J Biol Chem. 1997; 272:9464–9473.

Luque-Ortega JR, Rivas L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 1327-32.

Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. Apoptosis. 2003; 8: 115–128.

Mani J, Güttinger A, Schimanski B, Heller M, Acosta-Serrano A, Pescher P, Späth G, Roditi I. Alba-domain proteins of *Trypanosoma brucei* are cytoplasmic RNA-binding proteins that interact with the translation machinery. PLOS One. 2011;6: e22463.

McConville MJ, Ferguson MA. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. Biochem J. 1993; 294: 305-324.

McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. Microbiol Mol Biol Rev. 2002; 66:122-154.

McGwire BS, Chang KP, Engman DM. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. Infect Immun. 2003; 71: 1008-1010.

McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, Simpson RJ. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. Science. 2001; 291: 1755-1759.

McNicoll F, Drummelsmith J, Müller M, Madore E, Boilard, Oullette M, Papadoupoulo B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. Proteomics. 2006; 6: 3567-3581.

Mehta A, Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition. Complex inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *The J of Biol Chem*. 2004; 279: 11798-11813.

Melo-Braga M, Rocha-Azevedo R, Silva-Filho FC. *Tritrichomonas foetus*: the role played by iron during parasite interaction with epithelial cells. *Exp Parasitol*. 2003; 105: 111-120.

Menna-Barreto RF, de Castro SL. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *Biomed Res Int*. 2014: 614014.

Merschjohann K, Steverding D. *In vitro* growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense* by iron chelators. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2006; 5: 3.

Mesquita-Rodrigues C, Menna-Barreto RF, Sabóia-Vahia L, Da-Silva SA, de Souza EM, Waghabi MC, Cuervo P, De Jesus JB. Cellular growth and mitochondrial ultrastructure of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes are affected by the iron chelator 2,2-dipyridyl. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 17; 7(10): e2481.

Michels PA, Bringaud F, Herman M, Hannaert V. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1763:1463-1477

Miguel DC, Flannery AR, Mittra B, Andrews NW. Heme uptake mediated by LHR1 is essential for *Leishmania amazonensis* virulence. *Infect Immun*. 2013; 81(10): 3620-3626.

Mittra B, Andrews NW. IRONY OF FATE: role of iron-mediated ROS in *Leishmania* differentiation. *Trends Parasitol*. 2013 ;29 (10): 489-496.

Mittra B, Cortez M, Haydock A, Ramasamy G, Myler PJ, Andrews NW. Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. *J Exp Med*. 2013; 210: 401-416.

Mittra B, Laranjeira-Silva MF, Perrone Bezerra de Menezes J, Jensen J, Michailowsky V, Andrews NW. A trypanosomatid iron transporter that regulates

mitochondrial function is required for *Leishmania amazonensis* virulence. PLoS Pathog. 2016; 7; 12 (1): e1005340

Mondal S, Roy JJ, Bera T. Characterization of mitochondrial bioenergetic functions between two forms of *Leishmania donovani* - a comparative analysis. J Bioenerg Biomembr. 2014; 46 (5): 395-402.

Morwood SR, Nicholson LB. Modulation of the immune response by extracellular matrix proteins. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2006; 54: 367-374.

Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. Curr Opin Microbiol. 1998; 1 (4): 455-460

Mukherjee S, Sen Santara S, Das S, Bose M, Roy J, Adak S. NAD(P)H cytochrome b5 oxidoreductase deficiency in *Leishmania major* results in impaired linoleate synthesis followed by increased oxidative stress and cell death. J Biol Chem. 2012; 287: 34992-35003

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia N. Advances in leishmaniasis. The Lancet. 2005; 366: 1561-1577.

Muse KE, Roberts JF. Microbodies in *Crithidia fasciculata*. Protoplasma. 1973; 78:343–348.

Nagababu E, Gulyani S, Earley CJ, Cutler RG, Mattson MP, Rifkind JM. Iron-deficiency anaemia enhances red blood cell oxidative stress. Free Radic Res. 2008; 42: 824-829.

Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. Acta Haematol. 2009; 122: 78-86.

Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. Biochemistry. 2012; 51 (29): 5705-5724.

Patel N, Singh SB, Basu SK, Mukhopadhyay A. *Leishmania* requires Rab7-mediated degradation of endocytosed hemoglobin for their growth. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 11; 105 (10): 3980-3985.

Paulin JJ. The chondriome of selected trypanosomatids. A three dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy. J Cell Biol. 66: 404-413.

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. CID. 1996; 22: 1-13.

Pedersen JA, Swartz MA. Mechanobiology in the third dimension. Ann Biomed Eng. 2005; 33:1469-1490.

Pedrosa ML, Silva ME, Silva ME, Silva ME, Nicoli JR, Vieira EC. The effect of iron deficiency and iron overload on the evolution of Chagas disease produced by three strains of *Trypanosoma cruzi* in CFW mice. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol. 1990; 97(2): 235-243.

Petropolis DB, Rodrigues JC, Viana NB, Pontes B, Pereira CF, Silva-Filho FC. *Leishmania amazonensis* promastigotes in 3D Collagen I culture: an *in vitro* physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. PeerJ. 2014; 3:e317.

Plant AL, Bhadriraju K, Spurlin TA, Elliott JT. Cell response to matrix mechanics: focus on collagen. Biochim Biophys Acta. 2009; 1793: 893-902.

Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. Function and regulation of transferrin and ferritin. Semin Hematol. 1998; 35: 35-54.

Portman N, Lacomble S, Thomas B, McKean PG, Gull K. Combining RNA interference mutants and comparative proteomics to identify protein components and dependences in a eukaryotic flagellum. J Biol Chem. 2009; 284:5610-5619.

Pupkins ME, Tetley L, Coombs GH. *Leishmania mexicana*: amastigote hydrolases in unusual lysosomes. Exp Parasitol. 1986; 62:29-39.

Rajagopal A, Rao AU, Amigo J, Tian M, Upadhyay SK, Hall C, Uhm S, Mathew MK, Fleming MD, Paw BH, Krause M, Hamza I. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature*. 2008 19; 453 (7198):1127-1131.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40: 343-350.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous Leishmaniasis. *The Lancet*. 2007; 7: 581-596.

Reyes-Uribe P, Pereira-dos-Santos T, De Jesus JB, Mesquita-Rodrigues C, Arevalo J, Cupolillo E, Cuervo P. Comparative zymographic analysis of metallopeptidase of *Leishmania (Viannia) peruviana* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolates from Peru. *Parasitol Int*. 2012; 61 (4): 513-519.

Rhee S. Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. 2009. *Exp Mol Med*. 2009; 41: 858-865.

Ridgley E, Webster P, Patton C, Ruben L. Calmodulin-binding properties of the paraflagellar rod complex from *Trypanosoma brucei*. *Mol and Biochem Parasitol*. 2000; 109: 195-201.

Riemer J, Hoepken HH, Czerwinska H, Robinson SR, Dringen R. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem*. 2004; 15; 331(2): 370-375.

Rodvien R, Tavassoli M, Crosby WH. The structure of spleen in experimentally induced iron deficiency anaemia. *Am J Pathol*. 1974; 75: 243-254

Rogers ME. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front Microbiol*. 2012; 28(3): 223.

Russell DG, Wilhelm H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J Immunol*. 1986; 136 (7): 2613-2620.

Ryu JS, Choi HK, Min DY, Ha SE, Ahn MH. Effect of iron on virulence of *Trichomonas vaginalis*. J Parasitol. 2001; 87: 457-460.

Santhamma KR, Bhaduri A. Characterization of the respiratory chain of *Leishmania donovani* promastigotes. Mol Biochem Parasitol. 1995; 75(1): 43-53.

Schaible UE, Kaufman SHE. Iron and microbial infection. Nature Reviews Microbiol. 2004; 2: 946-954.

Schneider A. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. Int J Parasitol. 2001;31(13):1403-1415.

Sen G, Mukhopadhyay S, Ray M, Biswas T. Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. J Antimicrob Chemother 2008; 61: 1066–1075.

Sengputa S, Tripathi J, Tandon R, Raje M, Roy RP, Basu SK, Mukhopadhyay A. Hemoglobin endocytosis in *Leishmania* is mediated through a 46 kDa protein located in the flagellar pocket. J Biol Chem. 1999; 274: 2758-2765.

Shang Fu, Taylor Allen. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. Free Radical Biol & Med 2011; 51: 5-16.

Shiba T, Kido Y, Sakamoto K, Inaoka DK, Tsuge C, Tatsumi R, Takahashi G, Balogun EO, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Saimoto H, Moore AL, Harada S, Kita K. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110 (12): 4580-4585.

Simpson L. The kinetoplast of the hemoflagellates. Int Rev Cytol. 1972 32, 139–207.

Sinclair PR, Gorman N, Jacobs JM. Measurement of heme concentration. Curr Protoc Toxicol. 2001 May; Chapter 8: Unit 8.3.

Singh SB, Tandon R, Krishnamurthy G, Vikram R, Sharma N, Basu SK, Mukhopadhyay A. Rab5-mediated endosome-endosome fusion regulates

hemoglobin endocytosis in *Leishmania donovani*. EMBO J. 2003; 22(21):5712–5722.

Sitía R, Meldolesi J. Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. Mol Biol Cell. 1992; 3(10): 1067-1072.

Soteriadou K, Papavassiliou P, Voyiatzaki C, Boelart J. Effect of iron on the in vitro growth of *Leishmania* promastigotes. J Antimicrob Chemother 1995; 35: 23-29.

Souto-Padrón T, de Souza W. Fine structure and cytochemistry of peroxisomes (microbodies) *Leptomonas samueli*. Cell Tissue Res. 1982; 222(1):153-158.

Souza-Lemos C, de-Campos SN, Teva A, Porrozzi R, Grimaldi G. *In situ* characterization of the granulomatous response with time in nonhealing lesional skin of *Leishmania braziliensis*-infected rhesus macaques (*Macaca mulatta*). Vet Immunol and Immunopathol. 2011; 142: 147-155.

Stiehof YD, Ilg T, Russel DG, Hohenberg H, Overath P. Characterization of polymer release from the flagellar pocket of *Leishmania mexicana* promastigotes. J Cell Biol. 1994; 125:321–331.

Stuart K, Panigrahi AK. RNA editing: complexity and complications. Mol Microbiol. 2002; 45:591–596.

Subota I, Rotureau B, Blisnick T, Ngwabyt S, Durand-Dubief M, Engstler M, Bastin P. ALBA Proteins are Stage-Regulated during Trypanosome Development in the Tsetse Fly and Participate in Differentiation. Mol Biol Cell; 2011; 22:4205-4219.

Taylor MC, Kelly JM. Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. Parasitology. 2010; 137 (6): 899-917.

Taiz L, Zeiger E. Plant physiology. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 792p.

Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JC, Crepaldi PH, Pimenta PF, de Souza W. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. PLoS Pathog. 2013; 9 (10): e1003594.

- Tomás AM, Castro H. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19 (7): 696-707.
- Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*. 1992; 46: 65-94.
- Turrens JF. The role of succinate in the respiratory chain of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes. *Biochem J*. 1989; 15; 259 (2): 363-368.
- Ueda-Nakamura T, Attias M, de Souza W. Comparative analysis of megasomes in members of the *Leishmania mexicana* complex. *Res Microbiol*. 2007; 158:456-62
- Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol*. 2012; 28 (8): 335-344.
- Van Hellemond JJ, Tielens AGM. Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. *Parasitol Today*. 1998; 14: 265-271.
- Verma S, Mehta A, Shaha C. CYP5122A1, a novel cytochrome P450 is essential for survival of *Leishmania donovani*. *PLoS One*. 2011; 6: e25273.
- Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D, Skamene E, Olivier M, Jothy S, Gros P. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *Journal of Exp Med*. 1995; 182: 655-666.
- Voyiatzaki CS, Soteriadou KP. Identification and isolation of the *Leishmania* transferrin receptor. *The Journal of Biol Chem*. 1992; 267: 9112-9117.
- Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 1999; 283: 1482-1488.
- Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1763: 668-689.

- Walter PB, Knutson MD, Paler-Martinez A, Lee S, Xu Y, Viteri FE, Ames BN. Iron deficiency and iron excess damage mitochondria and mitochondrial DNA in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 2264-2269.
- Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem Journal*. 2011; 434: 365-381.
- Wheeler RJ, Sunter JD, Gull K. Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone. *J Cell Sci*. 2016; 129 (4): 854-867.
- Wilson ME, Vorhies RW, Andersen KA, Brotigan BE. Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. *Infect and Immun*. 1994; 62: 3262-3269.
- Wilson ME, Britigan BE. Iron acquisition by parasitic protozoa. *Parasitol Today*. 1998; 14: 348-353.
- Wilson ME, Lewis TS, Miller MA, McCormick ML, Britigan BE. *Leishmania chagasi*: uptake of iron bound to lactoferrin or transferrin requires an iron reductase. *Exp Parasitol*. 2002; 100: 196-207.
- Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009; 6(5): 359-362.
- Wisniewski JR, Mann M. Consecutive proteolytic digestion in an enzyme reactor increases depth of proteomic and phosphoproteomic analysis. *Anal Chem*. 2012; 84(6): 2631-2637.
- Wisniewski JR, Hein MY, Cox J, Mann M. A "Proteomic Ruler" for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. *Mol Cell Proteomics*. 2014; 13 (12): 3497-3506.
- WHO. Control of Leishmaniasis. WHO Technical Report Series 949. Geneva; 2010.
- Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol*. 2003; 132: 1-16.

Yeh KY, Yeh M, Mims L, Glass J. Iron feeding induces ferroportin 1 and hephaestin migration and interaction in rat duodenal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 296 (1): 55-65.

Yoon YS, Byun HO, Cho H, Kim BK, Toon G. Complex II defect via down regulation of iron-sulfur subunit induces mitochondrial dysfunction and cell cycle delay in iron chelation-induced senescence associated growth arrest. *The J of Biol Chem.* 2003; 278: 51577-51586.

Zaman MH, Trapani LM, Sieminski AL, Mackellar D, Gong H, Kamm RD, Wells A, Lauffenburger DA, Matsudaira P. 2006. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 10889-10894

8. ANEXOS

8.1. Cellular growth and mitochondrial ultrastructure of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes are affected by the iron chelator 2,2-dipyridyl

Artigo publicado na revista "Plos Neglected Tropical Diseases" 2013; 7; 10: e248.1

Cellular Growth and Mitochondrial Ultrastructure of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Promastigotes Are Affected by the Iron Chelator 2,2-Dipyridyl

Camila Mesquita-Rodrigues^{1,2}, Rubem F. S. Menna-Barreto³, Leonardo Sabóia-Vahia²,
Sílvia A. G. Da-Silva⁴, Elen M. de Souza³, Mariana C. Waghabi⁵, Patrícia Cuervo^{1*}, José B. De Jesus^{2,6*}

1 Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, **2** Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, **3** Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, **4** Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, **5** Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil, **6** Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Federal de São João de Rei, São João de Rei, Minas Gerais, Brasil

Abstract

Background: Iron is an essential element for the survival of microorganisms *in vitro* and *in vivo*, acting as a cofactor of several enzymes and playing a critical role in host-parasite relationships. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is a parasite that is widespread in the new world and considered the major etiologic agent of American tegumentary leishmaniasis. Although iron depletion leads to promastigote and amastigote growth inhibition, little is known about the role of iron in the biology of *Leishmania*. Furthermore, there are no reports regarding the importance of iron for *L. (V.) braziliensis*.

Methodology/Principal Findings: In this study, the effect of iron on the growth, ultrastructure and protein expression of *L. (V.) braziliensis* was analyzed by the use of the chelator 2,2-dipyridyl. Treatment with 2,2-dipyridyl affected parasites' growth in a dose- and time-dependent manner. Multiplication of the parasites was recovered after reinoculation in fresh culture medium. Ultrastructural analysis of treated promastigotes revealed marked mitochondrial swelling with loss of cristae and matrix and the presence of concentric membranar structures inside the organelle. Iron depletion also induced Golgi disruption and intense cytoplasmic vacuolization. Fluorescence-activated cell sorting analysis of tetramethylrhodamine ester-stained parasites showed that 2,2-dipyridyl collapsed the mitochondrial membrane potential. The incubation of parasites with propidium iodide demonstrated that disruption of mitochondrial membrane potential was not associated with plasma membrane permeabilization. TUNEL assays indicated no DNA fragmentation in chelator-treated promastigotes. In addition, two-dimensional electrophoresis showed that treatment with the iron chelator induced up- or down-regulation of proteins involved in metabolism of nucleic acids and coordination of post-translational modifications, without altering their mRNA levels.

Conclusions: Iron chelation leads to a multifactorial response that results in cellular collapse, starting with the interruption of cell proliferation and culminating in marked mitochondrial impairment in some parasites and their subsequent cell death, whereas others may survive and resume proliferating.

Citation: Mesquita-Rodrigues C, Menna-Barreto RFS, Sabóia-Vahia L, Da-Silva SAG, de Souza EM, et al. (2013) Cellular Growth and Mitochondrial Ultrastructure of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Promastigotes Are Affected by the Iron Chelator 2,2-Dipyridyl. PLoS Negl Trop Dis 7(10): e2481. doi:10.1371/journal.pntd.0002481

Editor: Armando Jardim, McGill university, Canada

Received: March 15, 2013; **Accepted:** August 26, 2013; **Published:** October 17, 2013

Copyright: © 2013 Mesquita-Rodrigues et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the following Brazilian agencies: FIOCRUZ/CNPq-PAPES (PC grant # 407724/2012-5). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pcuervo@fiocruz.br (PC); jbj@ioc.fiocruz.br (JBDJ)

Introduction

Leishmania (Viannia) braziliensis is a protozoan parasite widely distributed in the New World. This species is considered the main etiologic agent of American tegumentary leishmaniasis (ATL) [1] and has been associated with an extensive clinical polymorphism, ranging from simple cutaneous lesions to disseminated [2] and mucosal forms [3]. Like most living organisms, *Leishmania* require iron for their growth and survival. In these parasites, proteins involved in detoxification of reactive oxygen species, fatty acid desaturation and ergosterol synthesis have iron as a cofactor.

Among those proteins, iron superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), cytochrome b5 (CytB5) and cytochrome p450 (CYP) are the most studied [4,5]. In addition, iron is a component of ribonucleotide reductase and several heme-proteins and iron-sulfur clusters of the mitochondrial respiratory chain [5,6]. Thus, iron also plays an essential role in energy metabolism and DNA synthesis [7].

Promastigote forms of *Leishmania* can acquire iron from transferrin [8], lactoferrin [9] and hemoglobin [10,11]. However, amastigotes express a ferrous iron transporter (LIT1) that is essential for the intracellular growth of parasites and development

Author Summary

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a neglected disease that is widely distributed in the Americas. The protozoan parasite *Leishmania (Viannia) braziliensis* is one of the main causative agents of ATL, being responsible for the development of different clinical manifestations of the disease, which ranges from self-healing cutaneous lesions to disseminated and mucocutaneous forms. Because iron is essential for the survival and growth of *Leishmania*, as it is required for colonization of macrophages and development of lesions in mice, several chelating compounds have been tested for their effects on the growth of these parasites. In the present work, treatment of *L. (V.) braziliensis* with the iron chelator 2,2-dipyridyl inhibited the growth of promastigote forms in a dose- and time-dependent manner. However, multiplication of the parasites was recovered after reinoculation in fresh culture medium. The iron chelator also induced mitochondrial dysfunction and altered expression of proteins involved in metabolism of nucleic acids and coordination of post-translational modifications. The events described above ultimately caused the death of some parasites, most likely due to mitochondrial dysfunction, whereas others adapted and survived, suggesting a plasticity or resilience of the mitochondrion in this parasite.

of cutaneous lesions in mice [12]. Recently, the gene that codes for *Leishmania* ferric reductase 1 (LFR1) was identified in *L. (L.) amazonensis* [13]. LFR1 is a membrane protein with ferric reductase activity that is essential for conversion of extracellular Fe^{+3} into the soluble Fe^{+2} , which is then transported into the amastigotes by LIT1. The ferric reductase activity of LFR1 can be detected on the cell surface of several *Leishmania* species and is required for the differentiation of *L. (L.) amazonensis* into metacyclic forms capable of initiating infections in the mammalian host [13].

Withdrawal of iron from the culture medium by either depletion of transferrin from fetal bovine serum (FBS) or removal of FBS from the medium inhibits the proliferation of *L. (L.) chagasi* promastigotes [9]. Depletion of iron by chelators affects growth and metabolism in several protozoan parasites. Incubation of *L. (L.) major* promastigotes with iron-chelating compounds significantly suppresses parasite growth in a dose-response manner [14]. The iron chelator desferrioxamine (DFO) inhibits the growth of late trophozoites and primary schizonts of *Plasmodium falciparum* *in vitro* [15]. In *Trypanosoma brucei*, DFO decreases growth rate, DNA synthesis and oxygen consumption [16,17]. Depletion of iron by 2,2-dipyridyl, reduces the growth rate, adhesin synthesis and cytoadherence of *Trichomonas vaginalis* [18] and *Tritrichomonas foetus* [19]. Moreover, withdrawal of iron from the culture medium inhibits growth and induces drastic changes in the ultrastructure and proteomic pattern of *T. vaginalis* [20].

Despite the significance of iron for the growth, survival and establishment of infection by *Leishmania*, little is known about the role of this metal in the biology of the parasite. In this study we analyzed the effect of iron depletion on the proliferation, ultrastructure and protein expression pattern of *L. (V.) braziliensis*. The results show that iron depletion leads to a multifactorial response that results in cellular collapse, starting with the interruption of cell proliferation and culminating in marked mitochondrial impairment in some parasites and their subsequent cell death, whereas others may survive and resume proliferating.

Methods

Ethics statement

The *L. (V.) braziliensis* isolate IOC-L 2483 (MHOM/BR/2000/LTCP 13396) used in this study was obtained from the *Leishmania* collection of the Oswaldo Cruz Institute (Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, CLIOC) (<http://clioc.fiocruz.br/>). CLIOC is registered in the World Federation for Culture Collections (WFCC-WDCM 731) and is recognized as a Depository Authority by the Brazilian Ministry of the Environment (D.O.U. 05.04.2005).

Chemicals

All reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) or Merck (São Paulo, SP, Brazil). Milli-Q-purified water (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) was used to make all solutions. The iron chelator 2,2-dipyridyl is an organic, synthetic, membrane-permeable compound that associates with extracellular and intracellular iron, preferentially binding Fe^{+2} ions that constitute the cytosolic labile iron pool [21–23].

Parasite culture and proliferation

Promastigotes from *L. (V.) braziliensis* strain IOC-L 2483 were grown at 25°C in Schneider's medium supplemented with 20% (v/v) FBS (heat-inactivated at 56°C for 50 min). To evaluate the influence of iron chelation on parasite proliferation, 1×10^6 parasites were inoculated in fresh Schneider's medium in the absence (control) or presence of 25, 50, 100, 140 or 180 μM 2,2-dipyridyl and incubated at 25°C. Cellular density was determined every 24 h for eight days by counting with a hemocytometer. Three independent assays were carried out in triplicate.

Cytotoxicity of iron chelator on *L. (V.) braziliensis*

To evaluate the cytotoxicity of 2,2-dipyridyl on promastigote forms, 2×10^6 parasites were resuspended in 1 ml of Schneider's medium plus 20% FBS. This suspension (100 μl) was added to 80 μl of 2,2-dipyridyl solution to obtain final concentrations of 25–180 μM . Parasites (2×10^5 /well) were incubated in 96-well plates at 25°C for 16 or 40 h. After this period, 20 μl of resazurin (Invitrogen, OR, USA) was added to each well. Resazurin is a non-fluorescent, cell-permeable compound. After entering viable cells, which maintain a reducing environment within the cytosol, resazurin is continuously converted to resorufin, a highly fluorescent compound. After 8 h of incubation, fluorescence emitted due to conversion of resazurin into resorufin was detected at 570 nm (excitation peak) and 585 nm (emission peak). After the cytotoxicity assays, the results were plotted in graphs showing the fluorescence intensity versus the concentration of 2,2-dipyridyl. The inhibitory concentrations responsible for 50% reduction in cell viability (IC_{50}) were obtained after 24 and 48 h of treatment. Student's T test was used to compare promastigotes grown in control and iron-depleted medium. Differences with $p \leq 0.01$ were considered statistically significant.

Analysis of the reversibility of the effect of 2,2-dipyridyl on parasite proliferation

For this assay, 1×10^6 promastigotes at the logarithmic phase of growth were cultivated for 24 or 48 h in the presence or absence of 100 μM iron chelator. Subsequently, the parasites were washed $2 \times$ with PBS and inoculated in fresh Schneider's medium plus 20% FBS, and cell density was determined daily for eight days by counting with a hemocytometer. As an additional control, another sample of parasites was continuously cultured in the presence of

100 μM for four days. Three independent assays were carried out in triplicate.

Transmission electron microscopy (TEM) analysis

Promastigotes (5×10^6 cells/ml) were treated with 100 μM 2,2-dipyridyl for 24 h in Schneider medium at 25°C. Afterwards, the parasites were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.2) at room temperature for 40 min at 25°C and post-fixed with a solution of 1% OsO_4 , 0.8% potassium ferricyanide and 2.5 mM CaCl_2 in the same buffer for 20 min at 25°C. The cells were dehydrated in an ascending acetone series and embedded in PolyBed 812 resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a JEOL JEM1011 transmission electron microscope (Tokyo, Japan).

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) and plasma membrane integrity analysis

Promastigote forms of *L. (V.) braziliensis* were treated with 25, 50 or 100 μM 2,2-dipyridyl for 24 h or 48 h and subsequently evaluated for (a) the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) or (b) the plasma membrane integrity. To assess the $\Delta\Psi\text{m}$, the parasites were incubated with 50 nM tetramethylrhodamine (TMRE) (Molecular Probes, Carlsbad, USA) for 30 min. Alterations in TMRE fluorescence were quantified using an index of variation (IV) obtained by the equation $(\text{MT} - \text{MC})/\text{MC}$, where MT is the median fluorescence of treated parasites and MC, that of control parasites. Negative IV values correspond to depolarization of the mitochondrial membrane. As a positive control, 10 μM carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) (Sigma-Aldrich Chemical Co.), which dissipates the $\Delta\Psi\text{m}$, was added. To evaluate the plasma membrane integrity, labeling with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (PI) for 30 min was performed, using 0.1% saponin as the positive control. The samples were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, CA, USA) equipped with CellQuest software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, USA). A total of 10,000 events were acquired in the region previously established as that of the parasites. The Mann-Whitney test was used to compare the control and treated groups. Differences with $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

In situ labeling of DNA fragments by terminal deoxyribonucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)

Promastigote forms of *L. (V.) braziliensis* (10^6) were treated with 100 μM 2,2-dipyridyl for 24 h or 48 h, and *in situ* detection of DNA fragments was performed by TUNEL (Sigma-Aldrich Chemical Co). Promastigotes were centrifuged ($3,000 \times g$, 10 min, 4°C), resuspended in PBS, spotted onto slides previously treated with poly-L-lysine and air-dried. Then, they were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes and washed once with PBS. Subsequently, parasites were blocked with 0.03% H_2O_2 in methanol, washed in PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate for 2 min at 4°C. Positive controls were treated with 12 μl of $1 \times \text{DNase}$ for 15 min and blocked with 25 mM EDTA for 10 min. Finally, promastigotes were incubated with TUNEL reaction mixture for 60 min at 37°C. Then, they were washed and incubated with 300 μM DAPI (Invitrogen) for 2 min. After labeling, the material was washed with PBS, and coverslips were mounted on slides containing n-propyl-gallate. Images were acquired by phase contrast and fluorescence microscopy.

Sample solubilization and protein precipitation

Parasites (1×10^9) treated or not with 100 μM 2,2-dipyridyl for 24 h were harvested by centrifugation at $3,000 \times g$ for 10 min at 4°C, washed three times in PBS pH 7.2 and lysed (by 15 cycles of freezing and thawing in liquid nitrogen and ultrasonication) in hypotonic PBS buffer (13.6 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.4 mM Na_2HPO_4 , 0.15 mM KH_2PO_4) containing a cocktail of protease inhibitors. The lysate was centrifuged at $16,000 \times g$ for 30 min at 4°C to remove insoluble material, and the proteins in the resulting supernatant were precipitated with 10% (v/v) TCA and washed with cold acetone at $16,000 \times g$ for 10 min. Finally, the pellet was resuspended in IEF buffer (9 M urea, 4% CHAPS, 65 mM dithiothreitol (DTT) and 1% ampholytes pH 3–10) for 1 h at room temperature. Protein concentration was determined using the 2D Quant Kit (GE Healthcare). Proteins were aliquoted into single-use samples of 500 μg and stored at -80°C until analysis.

2DE electrophoresis, protein visualization and image analysis

For the first dimension, 500 μg protein was diluted to a final volume of 350 μl in rehydration solution (9 M urea, 4% CHAPS, 65 mM DTT, 1.5% ampholytes pH 3–10, 0.001% bromophenol blue). This solution was applied to IEF strips (18 cm pH 3–10 nonlinear; GE Healthcare) and submitted to isoelectric focalization at Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) at 20°C and a maximum current of 50 $\mu\text{A}/\text{strip}$. Focusing parameters and the second dimension were set as previously described [24]. Detection of spots and comparison of protein expression were performed using PDQuest software (Bio-Rad). The intensity of each spot, measured in parts per million (ppm), provided the basis for comparison of protein expression in parasites cultured in control medium or treated with the iron chelator. To normalize the intensity values, the pixel intensity of each spot, measured in ppm, was divided by the total intensity of all pixels present in the image.

Protein digestion, peptide extraction and analysis by mass spectrometry

Protein spots were manually excised and treated for digestion. Gel pieces were washed three times in 400 μl of 50% acetonitrile, 25 mM NH_4HCO_3 pH 8, dehydrated in acetonitrile 100% and dried in a vacuum centrifuge. Gel pieces were rehydrated in 15 μl of 50 mM NH_4HCO_3 with 200 ng of trypsin (Promega). After 15 min, 20 μl of 50 mM NH_4HCO_3 was added to keep gel pieces wet during tryptic digestion (37°C, overnight). To extract peptides, 20 μl of 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in 50% (v/v) acetonitrile were added, and samples were sonicated for 30 min. The separated liquid was concentrated under a vacuum to an approximate volume of 10 μl . Tryptic peptides were purified using ZipTip C18 pipette tips following the manufacturer's instructions (Millipore), eluted with 3.0 μl of 0.1% (v/v) TFA in 50% (v/v) acetonitrile and co-crystallized with matrix (7 mg/mL alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid) on a stainless-steel plate using 0.5 μl of matrix and 0.5 μl of sample. Mass spectra were acquired on a 5800 Proteomics Analyzer mass spectrometer (MALDI-TOF/TOFTM, Applied Biosystems) operating in delayed reflector mode with an accelerated voltage of 20 kV. MS/MS spectra corresponding to the five most intense signals were obtained automatically using the CID acquisition mode. Proteins were identified by searching in the non-redundant database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the program Mascot MS/MS ion search (Matrix Science, Oxford, UK, www.matrixscience.com/search_form_select.html). The search parameters in the Mascot server were lack of taxonomic

restrictions; permission of tryptic peptides with only one erroneous cleavage; carbamidomethylation of cysteine residues as a fixed modification and oxidation of methionine as a variable modification; 100 ppm mass tolerance for the MS mode; and 0.2 Da tolerance for its corresponding fragments in MS/MS. Proteins identified as hypothetical and therefore of unknown function were analyzed using InterProScan Sequence Search Tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) from the InterPro data library (<http://www.ebi.ac.uk/Interpro/>) to assign predicted functional domains [25]. This data library combines independent databases to generate an integrated source of information about protein families, domains, sites and regions, thus enhancing annotation. The data were analyzed following the standards proposed under the Minimum Information About a Proteomic Experiment MIAPE consensus [26].

Gene expression analysis

Total RNA was extracted from the cells by using Trizol Reagent. cDNA was synthesized from 2 µg total RNA using a commercial reverse transcription system (Promega). qPCR was performed in duplicate using the SYBR Green PCR Master Mix in Step-One equipment according to the manufacturer's protocol. Primers for amplifying the target and reference genes *EIF5A* (eukaryotic initiation factor 5A), *CAL* (calmodulin A), *UCEE2* (ubiquitin-conjugated enzyme E2), *UCELP* (ubiquitin-conjugating enzyme-like protein), *RP18* (ribonucleoprotein p18 mitochondrial precursor), *60S* (60S acid ribosomal protein P2) and *ACT* (actin) were designed based on the genome sequences available for *L. (V.) braziliensis* (Table S1). The data are shown as normalized ratios between the target gene expression and the reference gene [27]. Experiments were performed following the MIQE guidelines [28].

Results

Effect of iron chelator on proliferation of *L. (V.) braziliensis* promastigotes *in vitro*

To determine the influence of iron chelation on the growth of *L. (V.) braziliensis*, 1×10^6 promastigotes were incubated in 10 ml of Schneider's medium containing different concentrations of 2,2-dipyridyl (Figure 1). Cell density was measured daily for eight days of culture by counting in a hemocytometer chamber. In the control medium, promastigotes reached the late logarithmic phase of growth after six days. In the presence of 25 µM of the chelator, promastigote proliferation was reduced at all points of the curve. However, the growth curve profile was similar to that displayed by parasites grown in the control medium, reaching the logarithmic phase of growth at the sixth day. Treatment with 50–180 µM iron chelator resulted in a drastic inhibition of cell proliferation (Figure 1).

Cytotoxicity of 2,2-dipyridyl to *L. (V.) braziliensis*

The cytotoxicity of the iron chelator to the promastigote forms was assessed after 24 and 48 h using the Alamar Blue redox indicator. There was a dose-dependent relationship between the fluorescence emitted by reduction of resazurin and the concentration of the iron chelator. Concentrations of 100, 140 and 180 µM significantly affected the fluorescence emitted after 24 and 48 h of incubation compared with controls ($p < 0.01$) (Figure 2). We also observed a correlation between fluorescence and time of exposure to the iron chelator. In promastigotes treated with 100, 140 or 180 µM of the iron chelator, the values of fluorescence emitted after 48 h of incubation were lower than those emitted after 24 h. On the other hand, fluorescence emitted by reduction of resazurin was higher after 48 h of culture in the control medium. The same was observed for parasites treated with 25 or

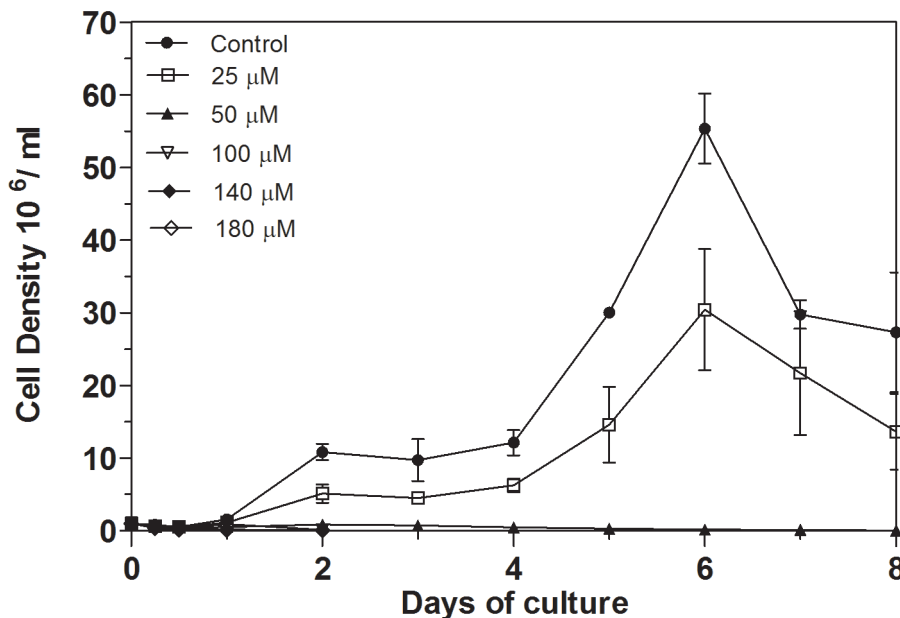


Figure 1. Effect of iron depletion on the growth curve of *L. (V.) braziliensis* promastigotes. Parasites were cultivated at 25°C in Schneider's medium supplemented with 20% of fetal bovine serum (control) or FBS-medium treated with 25, 50, 100, 140 or 180 µM 2,2-dipyridyl. The growth curve was monitored daily for eight days. Counts were performed in a hemocytometer. Bars represent means and standard errors obtained from three independent experiments. doi:10.1371/journal.pntd.0002481.g001

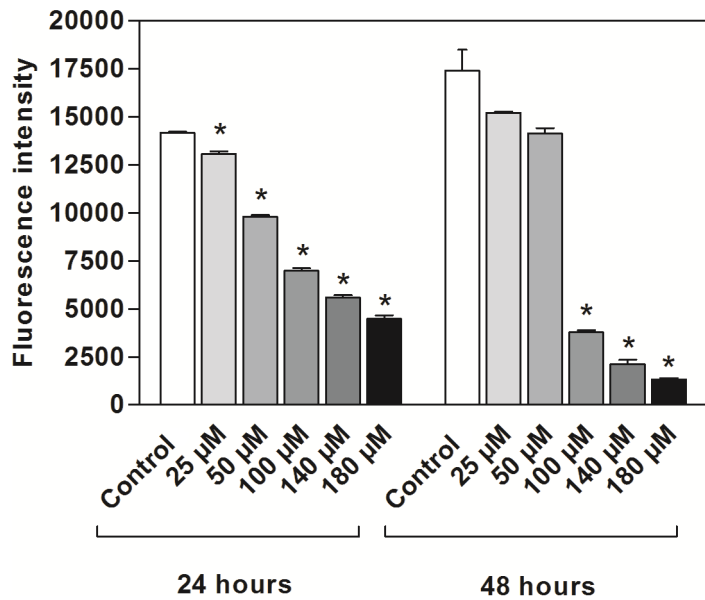


Figure 2. Cytotoxicity of 2,2-dipyridyl to *L. (V.) braziliensis* after 24 and 48 h. Parasites were incubated at 25°C in Schneider's medium in the absence (control) or presence of 25, 50, 100, 140 or 180 μM 2,2-dipyridyl. The graphs illustrate the relationship between time of incubation and fluorescence emitted after the reduction of resazurin. Bars represent means and standard errors obtained from three independent experiments. Asterisks represent a significant reduction in fluorescence after treatment of parasites in relation to the experimental control ($p < 0.01$, Student's T test).

doi:10.1371/journal.pntd.0002481.g002

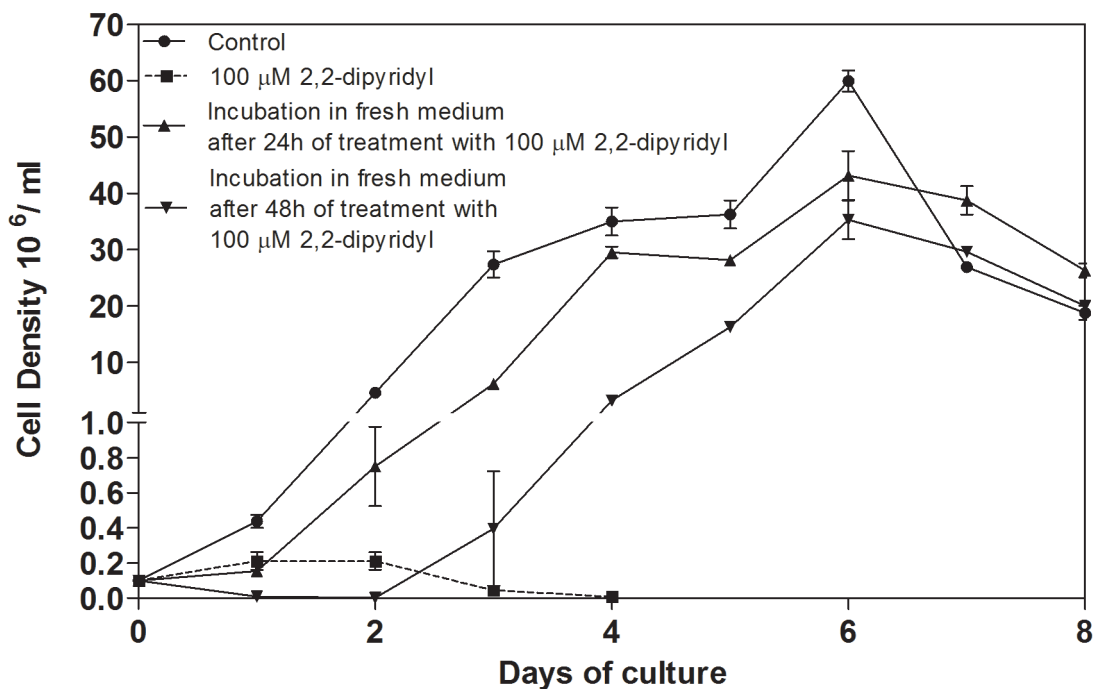


Figure 3. Reversibility of the effect of 2,2-dipyridyl on *L. (V.) braziliensis* proliferation. Parasites were incubated with 100 μM iron chelator and resuspended in Schneider's fresh medium after 24 h or 48 h of treatment. Cell density was determined daily for eight days by counting with a hemocytometer. Proliferation of parasites cultivated in the control medium as well as the growth of parasites continually cultured in the presence of 100 μM 2,2-dipyridyl were also monitored. Bars represent means and standard errors obtained from three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pntd.0002481.g003

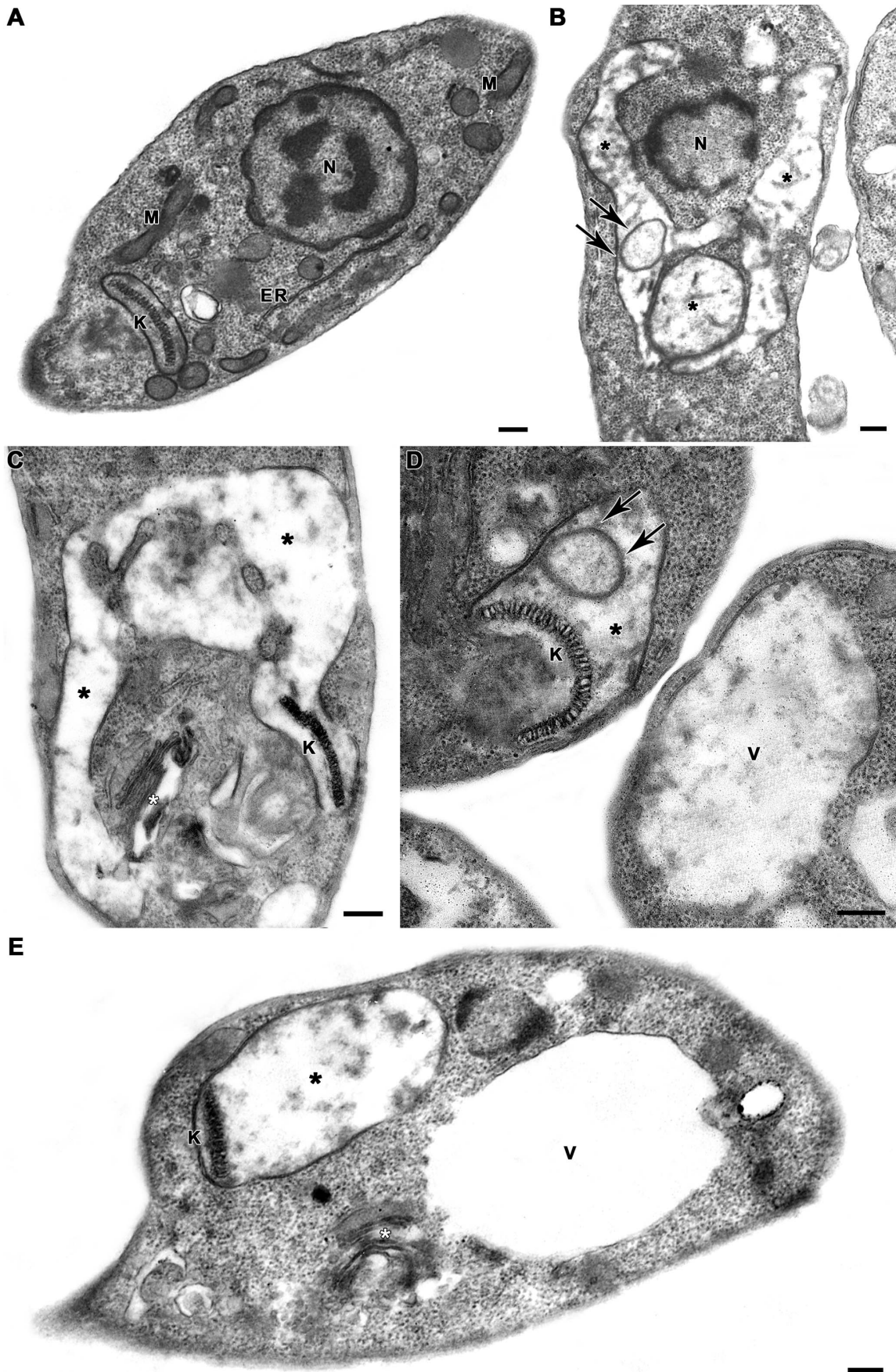


Figure 4. Ultrastructural effects of 2,2-dipyridyl on *L. (V.) braziliensis* promastigotes. (A) Untreated parasite presenting typical elongated morphology with normal kinetoplast (K), mitochondrion (M), endoplasmic reticulum (ER) and nucleus (N). (B–E) Promastigotes treated with 100 μM 2,2-dipyridyl revealed marked mitochondrial swelling with loss of cristae and matrix (black asterisks). There were concentric membranar structures inside the organelle (arrows), without any impairment of the classic kDNA arrangement. The treatment with 100 μM 2,2-dipyridyl also induced Golgi disruption (white asterisks) and extensive cytoplasmic vacuolization (V). Bars = 200 nm.
doi:10.1371/journal.pntd.0002481.g004

50 μM of 2,2-dipyridyl (Figure 2). Based on the relationship between the concentration of the iron chelator and the fluorescence emitted, the IC_{50} of 2,2-dipyridyl was 100 μM and 83.2 μM for 24 and 48 h, respectively.

Recuperation of parasite proliferation after treatment with 2,2-dipyridyl

To determine whether the multiplication of *L. (V.) braziliensis* could be recovered after treatment with 2,2-dipyridyl, parasites treated with 100 μM 2,2-dipyridyl were re-inoculated in fresh control medium and followed daily for eight days. Parasites treated for 24 h or 48 h with the chelator recovered their ability to proliferate after being placed in fresh Schneider's medium, reaching the stationary phase of growth on the same day as control parasites (Figure 3). The chelator-treated parasites exhibited slightly impaired proliferation during the early stage of growth (days 1–3.5), which reflected their re-adaptation to the fresh medium (Figure 3).

Effect of 2,2-dipyridyl on the ultrastructure of *L. (V.) braziliensis*

Ultrastructural analysis revealed severe damage to the parasite mitochondrion (Figure 4). Promastigotes treated with 2,2-dipyridyl presented mitochondrial swelling with concentric membranar structures inside the organelle (Figure 4B, D). Severe loss of cristae and matrix were also seen. Moreover, the matrix displayed a washed-out appearance, indicating a decrease in the electron density. (Figure 4B–E). Treatment with the iron chelator also induced Golgi disruption (Figure 4C, E) and extensive cytoplasmic vacuolization (Figure 4D–E). No damage to kinetoplast DNA (Figure 4C–E) or nuclear DNA was observed (Figure 4B).

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) and plasma membrane integrity analysis

Flow-cytometric analysis showed that 2,2-dipyridyl led to a dose-dependent decrease in the $\Delta\Psi\text{m}$ in comparison to control parasites (Table 1). Treatment with 25, 50 and 100 μM iron chelator induced a TMRE fluorescence reduction of 9%, 28% and 40% at 24 h and 7%, 2% and 25% at 48 h, respectively. Incubation of the cells with 10 μM FCCP dissipated the $\Delta\Psi\text{m}$ and consequently decreased the extent of TMRE labeling, strongly indicating the mitochondrial specificity of the TMRE labeling. The percentage of PI-positive cells was similar in control and treated parasites at 24 and 48 h, indicating that the plasma membrane of treated promastigotes did not suffer permeabilization (Figure 5).

Analysis of DNA fragmentation in *L. (V.) braziliensis* after treatment with iron chelator

DNA of promastigotes grown for 24 h or 48 h in the presence or absence of 2,2-dipyridyl was labeled exclusively by DAPI (Figure 6), indicating that treatment with the iron chelator did not induce DNA fragmentation. Because DNase induces DNA strand degradation, promastigotes treated with DNase were used as positive controls for the TUNEL assay. Promastigotes treated with DNase were labeled by TUNEL but not by DAPI (Figure 6).

Effect of 2,2-dipyridyl on the protein expression of *L. (V.) braziliensis* and on the mRNA levels of differentially expressed proteins

To investigate the effect of 2,2-dipyridyl on protein expression, whole extracts from parasites grown in control medium or treated with the iron chelator were submitted to 2DE (Figure 7). Image analysis was performed by comparing representative gels obtained from three different parasite suspensions for each condition assayed. The spots that showed a twofold ($2\times$) increase or decrease in pixel intensity were considered differentially expressed (Figure 7, Table 2). In addition, to further confirm that these pixel intensity differences represented distinct expression levels, we also characterized spots that were invariant between control and chelator-treated parasites (Figure S1, Table S2). Nine protein spots were down-regulated in parasites grown in the presence of the iron chelator (Figure 7, Table 2). Comparative close-ups of different regions of the gels show the proteins that were differentially expressed between parasites cultivated in the presence and in the absence of the iron chelator (Figure 8 A–E). The proteins are numbered according to Figure 7. The intensity of each differentially expressed spot is represented in the graphs and histograms arranged together with the close-ups (Figure 8 A–E). Although spot 19, corresponding to cytochrome *c* oxidase, showed a less than twofold decrease in the chelator-treated parasites, it was included in the differential analysis because a subtle decrease in the expression of this protein could have substantially contributed to the mitochondrial dysfunction observed here (Figure 8E). The biological and/or molecular function of the differentially expressed proteins was inferred from the terms of gene ontology (GO) available in TriTrypDB (<http://tritrypdb>).

Table 1. Flow cytometry analysis of $\Delta\Psi\text{m}$ and plasma membrane integrity in *L. (V.) braziliensis* promastigotes.

	% TMRE+		Index of Variation (IV) ¹	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Control	96.0 \pm 1.1 ²	98.0 \pm 0.7	0.00	0.00
control + 10 μM FCCP	12.0 \pm 8.2*	32.1 \pm 5.3*	-0.74	-0.52**
25 μM 2,2-dipyridyl	95.6 \pm 2.4	94.6 \pm 3.8	-0.09**	-0.07
50 μM 2,2-dipyridyl	93.3 \pm 3.8	96.4 \pm 3.2	-0.28**	-0.02
100 μM 2,2-dipyridyl	89.3 \pm 6.3	73.9 \pm 12.0*	-0.40**	-0.25**

TMRE+ = promastigotes labeled by tetramethylrhodamine. FCCP = carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine.

¹IV = (MT - MC)/MC, where MT corresponds to the median TMRE fluorescence of treated parasites and MC corresponds to the median TMRE fluorescence of control parasites.

²Mean \pm standard deviation of 4 independent experiments. Asterisks indicate significant differences in relation to the control group at each time (* $p\leq 0.01$; ** $p\leq 0.03$).

doi:10.1371/journal.pntd.0002481.t001

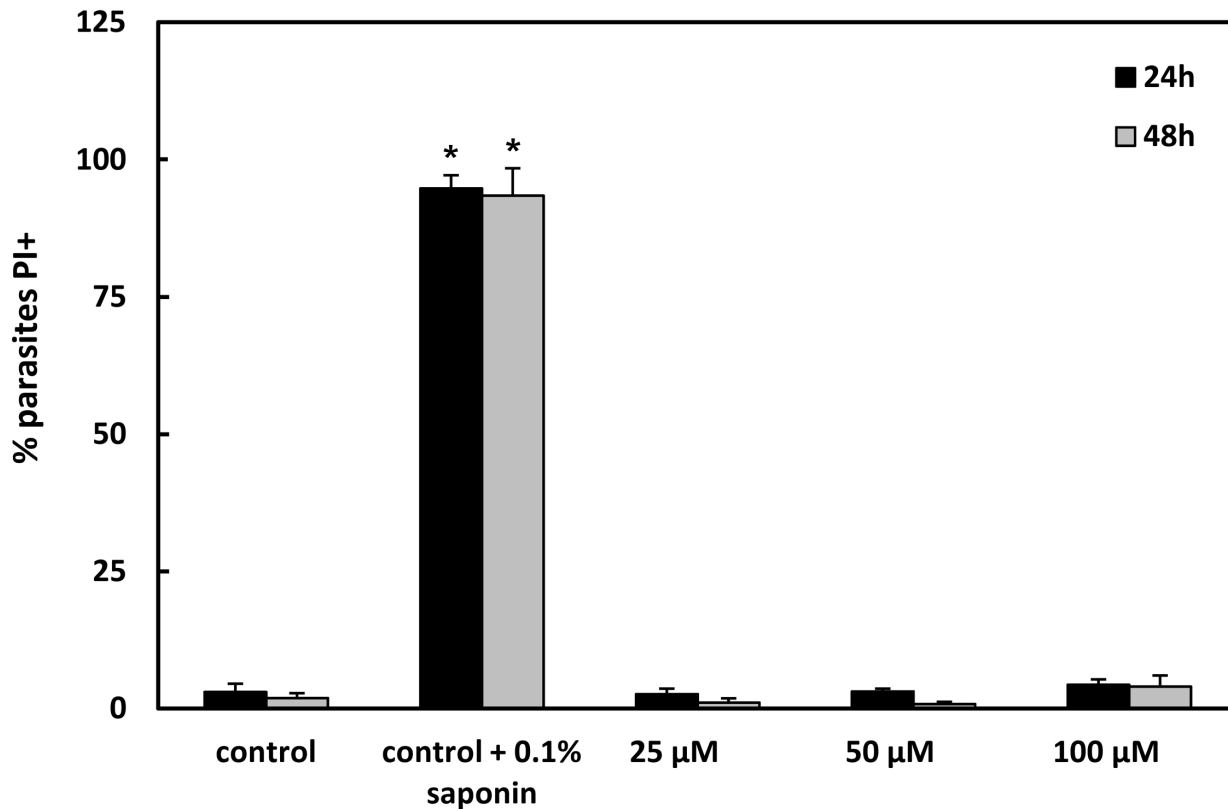


Figure 5. Flow cytometry analysis of *L. (V.) braziliensis* promastigotes' plasma membrane integrity after 24 and 48 h. Parasites were incubated at 25°C in Schneider's medium in the absence (control) or presence of 25, 50 or 100 μM 2,2-dipyridyl. In addition, control parasites were treated with 0.1% saponin. The samples were labeled with labeling with 30 μg/mL propidium iodide (PI) and analyzed in a FACSCalibur flow cytometer. Mean ± standard deviation of 3 independent experiments. Asterisks indicate significant differences in relation to the control (untreated) group at each time (* $p \leq 0.05$).

doi:10.1371/journal.pntd.0002481.g005

org/tritrypdb/) or using InterProScan Sequence Search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) (Table 2). The differentially expressed proteins were associated with nucleic acid metabolism, calcium homeostasis, signaling and post-translational modifications of proteins. To determine whether the differential expression of proteins induced by 2,2-dipyridyl resulted from modulation at the mRNA level, primers were designed for the gene encoding each protein, and qPCR was performed. The results show that there was no difference in the mRNA expression level of any protein (Figure S2).

Discussion

Protozoan parasites, including *Leishmania*, depend on iron for survival and proliferation, as well as for the success of the colonization of the host. This means hosts should limit the parasite's access to the metal to counteract the infection. Although iron deprivation by chelating agents inhibits the growth of several protozoan parasites [15,17–20,29–31], the effect of iron chelation on *L. (V.) braziliensis* had not yet been addressed. In this paper, the effects of iron chelation on the growth, ultrastructure and protein expression of this parasite is described for the first time.

The proliferation and viability of *L. (V.) braziliensis* promastigotes was affected by both the concentration of the iron chelator and the time of exposure to iron-depleted medium. Parasite proliferation was completely inhibited after 24 h of exposure to 100 μM 2,2-dipyridyl. At this concentration, after 3 days, we observed a complete loss of cell viability. A possible explanation for the

decrease in proliferation and viability may be related to the lack of protoporphyrin IX needed for tetrapyrrole biosynthesis. In fact, *Leishmania* spp. as well as other trypanosomatids are defective in several enzymes of the heme biosynthesis pathway and require exogenous sources of protoporphyrin IX or heme to sustain their viability [32–34]. Chelation of iron from the hemoglobin in the culture medium by 2,2-dipyridyl could provoke loss of the protoporphyrin IX required for tetrapyrrole biosynthesis, which could induce a defect in the electron transport respiratory complexes.

The inhibition of *Leishmania* spp. proliferation by iron chelators seems to rely also on the decrease of the activity of crucial enzymes. The iron chelator quercetin down-regulates the activity of ribonucleotide reductase, a Fe-dependent enzyme, and inhibits the proliferation of *L. (L.) donovani* amastigotes *in vivo* [35]. This enzyme catalyzes the rate-limiting step in DNA synthesis in these parasites, directly affecting their proliferation. A decrease in the activity of ribonucleotide reductase is also observed after treatment of tumor cells with iron chelators [6]. In the present study, 2,2-dipyridyl might have prevented the incorporation of cellular iron into newly synthesized iron-dependent proteins, including enzymes involved in DNA synthesis, resulting in the inhibition of *L. (V.) braziliensis* promastigote proliferation.

Iron deprivation induces mitochondrial dysfunction in various cell types. Ultrastructural analysis of lymphocytes, macrophages and reticular cells from the spleen of rabbits fed a low-iron diet has revealed mitochondrial swelling and loss of cristae and matrix of the organelle [36]. Similar changes are observed in the ultrastructure of

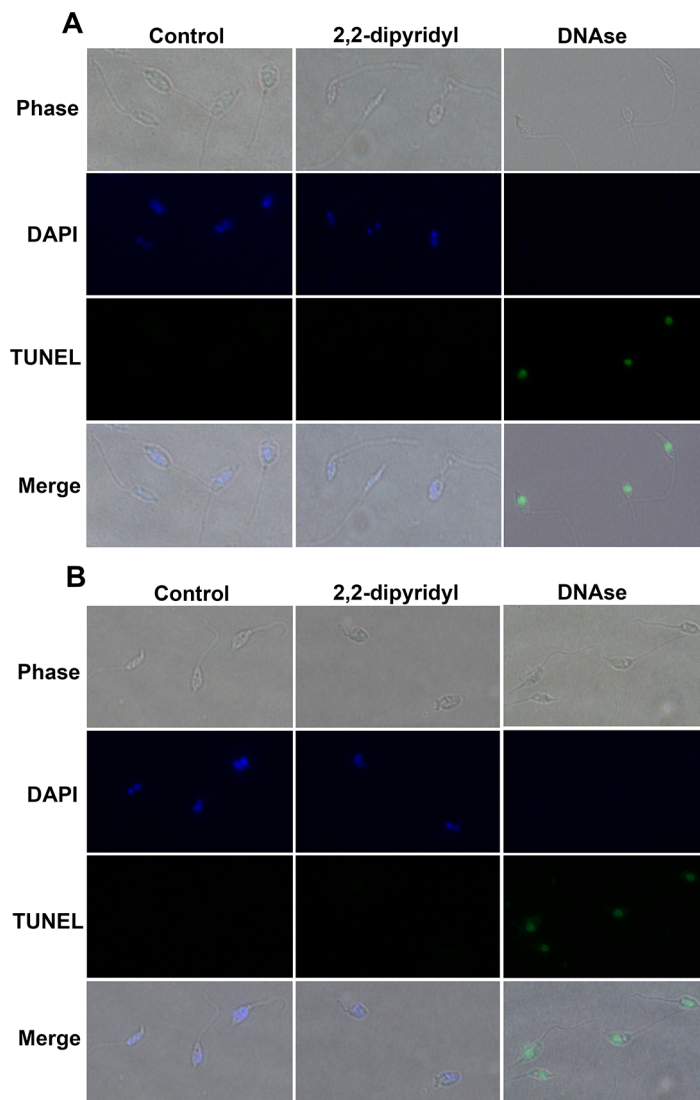


Figure 6. TUNEL assay. Promastigotes cultivated in control medium or treated with 100 μ M 2,2-dipyridyl for 24 h (A) or 48 h (B) were examined by phase contrast microscopy and fluorescence microscopy at 100 \times . DAPI (blue channel) revealed intact nuclei and kinetoplasts in both control and treated promastigotes. TUNEL (green channel) detected DNA fragmentation exclusively in promastigotes treated with DNase. Merged images show the localization of the nuclei and kinetoplasts inside the cells.
doi:10.1371/journal.pntd.0002481.g006

lymphocytes from peripheral blood of anemic humans [37]. Here, analysis of the $\Delta\Psi_m$ and the ultrastructure of *L. (V.) braziliensis* after treatment with the iron chelator revealed drastic damage to the mitochondrion of the parasite. Incubation of promastigotes with TMRE and subsequent analysis by flow cytometry showed that treatment with the iron chelator dissipated Δm in a dose-dependent manner. Moreover, TEM analysis of promastigotes cultured in iron-depleted medium demonstrated that parasites presented major mitochondrial injury. Because iron is an essential element for cellular respiration (acting as a cofactor of the mitochondrial enzymatic complexes and aconitase), several mechanisms may be associated with mitochondrial damage in iron-depleted medium. For example, Fe^{2+} and Fe^{3+} associate with S^{2-} , forming Fe-S clusters that receive and donate electrons in electron transport chain and Krebs cycle [38]. Dissipation of $\Delta\Psi_m$ and reduction of ATP synthesis are associated with a decrease in the expression of the Fe-S subunit from complex II of hepatic Chang cells after treatment with the iron chelator DFO [39]. Although there are no reports

regarding the effect of iron deprivation on the ultrastructure and mitochondrial activity of *Leishmania* spp., inhibition of *L. (L.) donovani* mitochondrial enzymatic complexes II and III by specific inhibitors also results in reduced ATP synthesis, increased concentration of cytosolic Ca^{2+} and dissipation of the $\Delta\Psi_m$ [40]. Thus, it is possible to suggest that iron deprivation in *L. (V.) braziliensis* promastigotes induces a reduction or complete inhibition of ATP synthesis, leading to mitochondrial swelling and dissipation of $\Delta\Psi_m$. In fact, in mammal cells, reduction of ATP synthesis may lead to the opening of the mitochondrial permeability transition pore that allows the entrance of water and solutes (K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} ions), which culminates in mitochondrial swelling and $\Delta\Psi_m$ dissipation [41].

Although the sequence of events described above may characterize one possible mechanism of the iron chelator's action, it is likely that some promastigotes did not suffer from these effects. In fact, some parasites treated for 48 h with the iron chelator partially recovered from the dissipation of $\Delta\Psi_m$. These results suggest that during treatment with the iron chelator, some

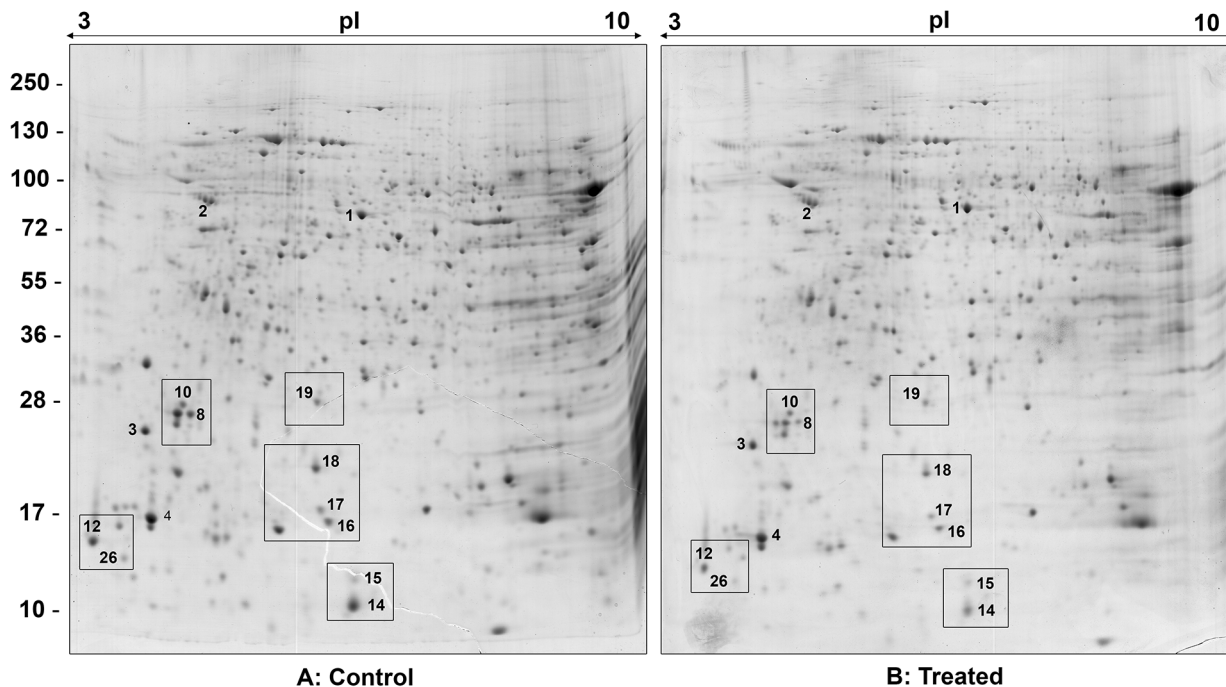


Figure 7. 2DE map of soluble proteins from promastigotes cultivated in (A) control medium or (B) medium with 2,2-dipyridyl. Proteins were separated over a pH range of 3–10 in 12% SDS-polyacrylamide gel. Protein spots were visualized by colloidal Coomassie Blue G-250 staining. Differentially expressed proteins are numbered, and details of their identification are shown in Table 2 and Table S2. doi:10.1371/journal.pntd.0002481.g007

parasites suffered growth arrest and died, most likely due to mitochondrial dysfunction, whereas others adapted and survived for at least 48 h. This hypothesis is reinforced by the observation that treated parasites recovered their proliferation after reinoculation in fresh Schneider's medium without the iron chelator. In accord with this possibility, it was recently demonstrated that iron depletion induces a cellular adaptation that ultimately modulates the differentiation of promastigote into amastigote forms through the regulation of H_2O_2 level [42]. In the present study, TUNEL and PI assays showed that parasites treated for 24 or 48 h with the iron chelator did not undergo DNA fragmentation or cell membrane permeabilization. These results are consistent with the considerations above, indicating that those promastigotes that die from iron depletion may undergo an incidental type of cell death [43], while others can adapt to the nutritional stress and survive. In addition, we cannot rule out that 2,2-dipyridyl is cytotoxic to the parasites that die. However, the mechanism involved in the cytotoxicity of this compound would seem to be distinct from the DNA cleavage described in the literature [44].

The inhibition of proliferation and the ultrastructural alterations suffered by *L. (V.) braziliensis* promastigotes cultivated in iron-depleted medium were followed by changes in protein expression. According to the functional classification obtained from gene ontology terms, three down-regulated proteins (chain eukaryotic initiation factor 5A, 60S acid ribosomal protein P2 and mitochondrial ribonucleoprotein p18 precursor) are involved in the metabolism of nucleic acids, specifically by binding to RNA during translational elongation. Down-regulation of these proteins in iron-depleted conditions could be associated with inhibition of promastigote proliferation. In addition, down-regulation of proteins localized in the mitochondrion, such as p18 ribonucleoprotein mitochondrial precursor and cytochrome *c* oxidase subunit V, could be associated with the ultrastructural damage that this organelle suffered in the absence of iron. Cytochrome *c* oxidase,

also known as complex IV, transfers electrons from cytochrome *c* to molecular oxygen in the mitochondrial respiratory chain. This enzymatic complex has heme as a cofactor and therefore depends directly on iron. In the present study, chelator-treated promastigotes showed a small decrease in the expression of cytochrome *c* oxidase, which may have contributed to the mitochondrial dysfunction observed. Thus, the ultrastructural damage observed in the mitochondrion could have been a consequence of iron chelation from the enzymes of the mitochondrial respiratory chain as well as of the down-regulation of other mitochondrial proteins. The proteins ubiquitin-conjugated enzyme E2 and ubiquitin-conjugating enzyme-like protein were down-regulated after the treatment with the iron chelator. The ubiquitin-proteasome system is a cytosolic multi-component machinery that selectively degrades proteins [45,46]. Our results suggest that the down-regulation of these enzymes could be associated with the decrease of general metabolism of promastigotes submitted to iron deprivation. However, the role of iron depletion in the regulation of ubiquitin-conjugated enzyme E2 proteins remains to be elucidated.

Two down-regulated hypothetical proteins were identified in promastigotes cultivated in iron-depleted conditions. Concerning the hypothetical protein XP_001467133, no function could be assigned from the databases we searched. On the other hand, the hypothetical protein XP_001563170, identified in spot 14, was found to contain domains characteristic of proteins from the ALBA family. Proteins from the ALBA family bind to double-stranded DNA, rRNA and mRNA and may have a role in maintaining the structural and functional stability of RNAs and ribosomes. ALBA proteins are located in the cytoplasm of *T. brucei* and aggregate in mRNA-containing granules upon nutritional deprivation [47]. In addition, these proteins regulate the development of *T. brucei* in the insect vector and participate in the differentiation of the parasite [47]. Moreover, depletion of

Table 2. Proteins differentially expressed by *L. (V.) braziliensis* promastigotes cultivated in control or chelator-treated medium.

Code	Protein Name	NCBI Accession N°	Theor. MW (Exp. MW)	Theor. p/ (Exp p/)	Matching pep./Pep. identified by MS/MS	Peptide Sequences	Error ± ppm	Protein Score	Expression in control medium	Expression in chelator-treated medium	BP, CC and MF
8	Chain A, <i>Leishmania braziliensis</i> Eukaryotic Initiation Factor 5a	1X60_A	18.93	5.42	3/2	TYPLAAGALK	-50	215	+	-	BP: Regulation of translational elongation; CC: MF: RNA binding
			(27)	(5.21)		VSVATDIFTGNR	-45				
						LEDQAPSTHNVEVPVK	-49				
10	Chain A, <i>Leishmania braziliensis</i> Eukaryotic Initiation Factor 5a	1X60_A	18.93	5.42	3/3	TYPLAAGALK	-64	295	+	-	BP: Regulation of translational elongation; CC: MF: RNA binding
			(27)	(5.1)		VSVATDIFTGNR	-58				
						LEDQAPSTHNVEVPVK	-71				
12	calmodulin A <i>Trypanosoma brucei</i>	AAA30174	16.82	4.10	6/6	A■DLSNEQISEFK	-94	546	+	-	CC: Flagellum; MF: Calcium ion binding
			(13.5)	(4.2)		EAFSLFDKDGDTITTK	-95				
						VFDKDGNGFNSAAELR	-57				
						DGNFNSAAELR	-51				
						LTDEEVDEM↑IR	-89				
						EADVDDGGQINVEEFVK	-95				
14	hypothetical protein <i>Leishmania braziliensis</i>	XP_001563170	13.30	5.71	5/5	KFGYVDYTK	-84	365	+	-	ND
			(10)	(5.98)		FGYVDYTK	-81				
						AQFDDVR	-54				
						STTTDKIEVTWK	-91				
						SPDFDAIYEQQQK	-91				
15	hypothetical protein <i>Leishmania infantum</i>	XP_001467133	13.69	5.9	1/1	FFLSNPDHWR	-48	60	+	-	ND
			(12)	(5.97)							
16	ubiquitin conjugated enzyme E2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	XP_812602	16.87	6.08	1/1	VLLSVCSLLTDPNPDPLVPDIAR	-66	77	+	-	BP: regulation of protein metabolic process
			(14.5)	(5.84)							
17	ubiquitin-conjugating enzyme like protein <i>Leishmania braziliensis</i>	XP_001563284	16.26	5.93	2/2	DTEDIYHYWNGTIVGPPSSTFEYR	-52	59	+	-	BP: regulation of protein metabolic process MF: post-translational protein modification
			(15.2)	(5.81)		VNLPCVDPDGTVNR	-81				

Table 2. Cont.

Code	Protein Name	NCBI Accession N°	Theor. MW (Exp. MW)	Theor. p/ (Exp p/)	Matching pep./Pep. identified by MS/MS	Peptide Sequences	Error ± ppm	Protein Score	Expression in control medium	Expression in chelator-treated medium	BP, CC and MF
18	ribonucleoprotein p18 mitochondrial	XP_001563480	21.69 (20)	6.74 (5.78)	5/4	KYDLFGYVDNTAPWIEK NCPDLETYNATLQR	-76 -75	462	+	-	CC: mitochondria
	precursor <i>Leishmania braziliensis</i>					IFEAPSKQDKPVDNESH	-92				
19	cytochrome c oxidase subunit V [<i>Leishmania infantum</i>]	XP_001470514	22.38 (28)	6.1 (5.78)	3/2	ADGKEHPSALAAQQQSLFEIK EHPALAAQQQSLFEIK GWDNAALDTIYSSMLR	-74 -89 -90	278	+	-	BP: cellular metabolic process; CC: mitochondria; MF: electron carrier activity
26	60S acid ribosomal protein P2 <i>Leishmania braziliensis</i>	XP_001566999	10.65 (13)	4.38 (4.6)	3/3	VFLPHLGDPHR GAEIPDHVFQTPAVIER AAGVAELSR	-88 -92 -71	265	+	-	BP: Translational elongation; CC: ribosome; MF: Structural constituent of ribosome
						VDALFQLELGKSFDELM TEGR	-87				
						LVGSGSAAPAAAAS- TAGAAVAAAADAK	-85				

Proteins were extracted, submitted to 2D electrophoresis and identified by mass spectrometry using Mascot software and no redundant NCBI database. BP = biological process; CC = cellular component; ND = not detected; MF = molecular function; MW = molecular weight; p/ = isoelectric point; p = parts per million; ▲ = methionine oxidation; ■ = acetylation. doi:10.1371/journal.pntd.0002481.t002

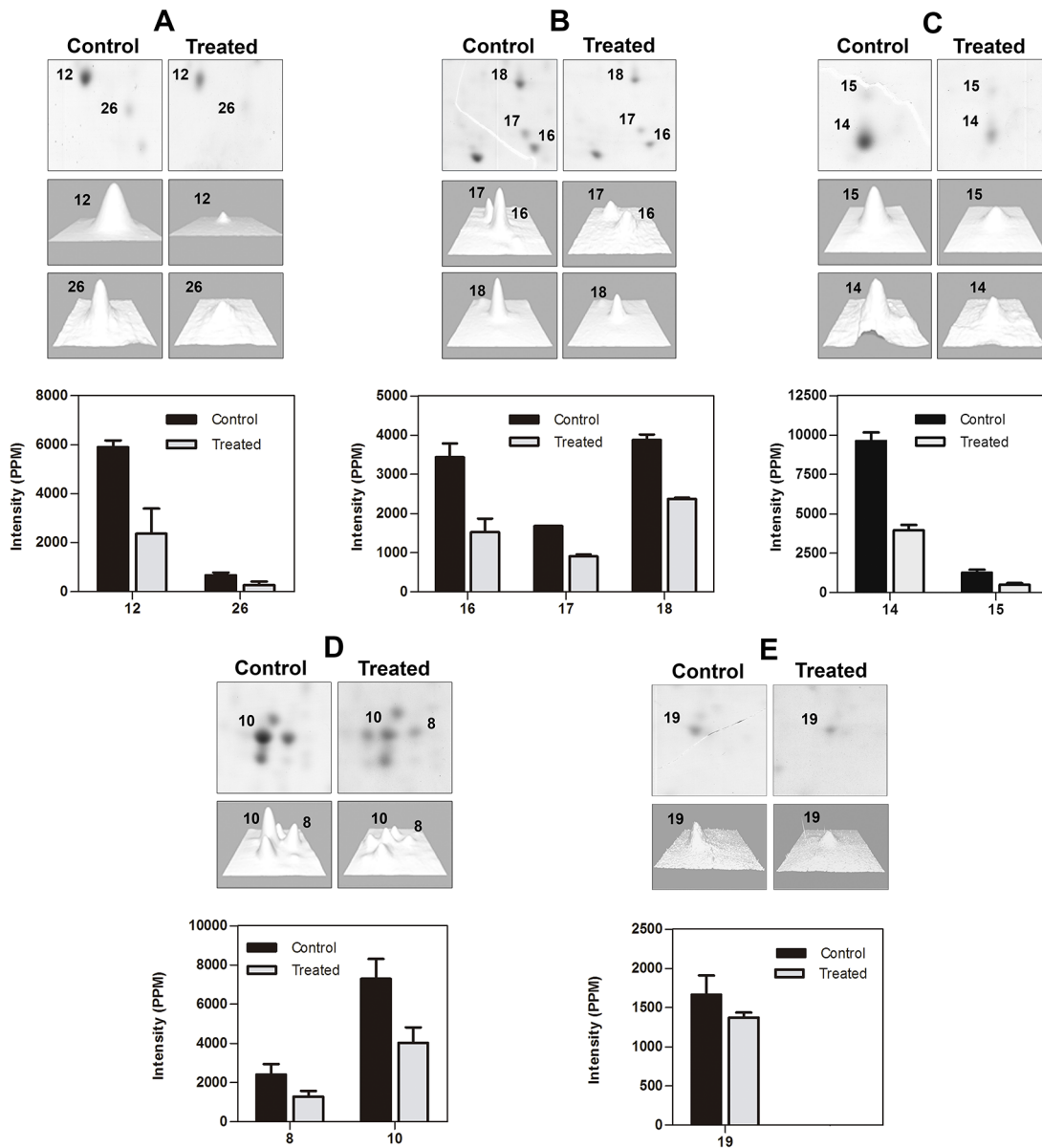


Figure 8. Close-up of the gel regions showing differentially expressed proteins in control and treated parasites. (A–E) Close-ups of different regions of the gels showing up-regulated and down-regulated proteins. The degree of differential expression is shown in the histograms, presented as a grouped bar chart with error bars. Each bar represents the intensity means \pm S.D. of gels from three independent experiments. doi:10.1371/journal.pntd.0002481.g008

ALBA proteins reduces the initiation of protein translation and induces parasite growth arrest [48]. Thus, the down-regulation of this hypothetical protein XP 001563170, which contains ALBA domains, is in agreement with the general decrease of protein synthesis in the parasites treated with the iron chelator.

Calmodulin A was also down-regulated in iron-depleted promastigotes. Calmodulin is a key axonemal calcium sensor closely associated with ciliary motility and signaling processes in eukaryotes [49]. In *T. brucei*, another trypanosomatid, the down-regulation of this protein results in growth arrest and loss of cell viability [50]. Also in *T. brucei*, calmodulin is located in the flagellum and possibly takes part in the movement of the microtubules from the axoneme during the flagellar beat cycle [51–53]. Recycling of the transferrin receptor to the cell surface and exocytosis of transferrin [54] are calmodulin-dependent

events, demonstrating a direct relationship between iron homeostasis and the expression of this protein. Decreased expression of calmodulin in the absence of iron could have led to the loss of motility and cell viability observed here in *L. (V.) braziliensis*, and it could have resulted in the loss of iron homeostasis in the promastigotes. When the transcript levels of differentially expressed proteins were analyzed, no differences were observed between treated and control parasites, confirming the poor correlation between mRNA and protein levels in *Leishmania* [55,56].

Although the complexity of the mechanisms regulated by iron in *Leishmania* spp. are not completely understood, our results show that iron depletion leads to a multifactorial response that results in cellular collapse, starting with the interruption of cell proliferation and culminating in marked mitochondrial impairment in some

parasites and their subsequent cell death, whereas others may survive and resume proliferating. Although iron is a crucial element to the biosynthesis of mitochondrial complexes, the parasites' survival in the absence of iron suggests a plasticity or resilience of the mitochondrion, as observed in other trypanosomatids under different environmental conditions [57,58]. We suggest that, as has been proposed for *T. cruzi* and *T. brucei* submitted to different experimental conditions, other energetic pathways, such as glycolysis, could be accentuated in *Leishmania* after treatment with 2,2-dipyridyl to compensate for the mitochondrial dysfunction; however, this hypothesis must be further investigated in these parasites.

Supporting Information

Figure S1 Close-up of the gel regions showing invariant proteins. (A–D) close-ups of different regions of the gels showing invariant proteins in both control and treated parasites. Each bar in the histograms represents the intensity means \pm S.D. of gels from three independent experiments. (TIF)

Figure S2 mRNA expression levels in control and treated *L. (V.) braziliensis* promastigotes. *EIF5A*, *CAL*, *UCEE2*, *UCELP*, *RP18* and *60S* mRNA expression levels were measured by qPCR. The values are expressed as normalized ratios of the target gene expression to the endogenous control, actin.

References

- Grimaldi G Jr, Tesh RB. (1993) Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6: 230–250.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, et al. (2002) Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis* 186: 829–834.
- Marsden PD. (1986) Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 859–876.
- Taylor MC, Kelly JM. (2010) Iron in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology* 137: 899–917.
- Tripodi KE, Menendez Bravo SM, Cricco JA. (2011) Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways. *Enzyme Res* 2011: 873230.
- Sen G, Mukhopadhyay S, Ray M, Biswas T. (2008) Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. *J Antimicrob Chemother* 61: 1066–1075.
- Wilson ME, Britigan BE. (1998) Iron acquisition by parasitic protozoa. *Parasitol Today* 14: 348–353.
- Voyiatzaki CS, Soteriadou KP. (1992) Identification and isolation of the *Leishmania* transferrin receptor. *J Biol Chem* 267: 9112–9117.
- Wilson ME, Vorhies RW, Andersen KA, Brotigan BE. (1994) Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. *Infect Immun* 2: 3262–3269.
- Sengputa S, Tripathi J, Tandon R, Raje M, Roy RP, et al. (1999) Hemoglobin endocytosis in *Leishmania* is mediated through a 46 kDa protein located in the flagellar pocket. *J Biol Chem* 274: 2758–2765.
- Krishnamurthy G, Vikram R, Singh SB, Patel N, Agarwal S, et al. (2005) Hemoglobin receptor in *Leishmania* is a hexokinase located in the flagellar pocket. *J Biol Chem* 280: 5884–5891.
- Huynh C, Sacks DL, Andrews NW. (2006) A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. *J Exp Med* 203: 2363–2375.
- Flannery AR, Huynh C, Mitra B, Mortara RA, Andrews NW. (2011) LFR1 Ferric Iron Reductase of *Leishmania amazonensis* is essential for the generation of infective parasite forms. *J Biol Chem* 286: 23266–23279.
- Soteriadou K, Papavassiliou P, Voyiatzaki C, Boelart J. (1995) Effect of iron on the *in vitro* growth of *Leishmania* promastigotes. *J Antimicrob Chemother* 35: 23–29.
- Atkinson CT, Bayne MT, Gordeuk VR, Brittenham GM, Aikawa M. (1991) Stage-specific ultrastructural effects of desferrioxamine on *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Am J Trop Med Hyg* 45: 593–601.
- Breidbach T, Scory S, Krauth-Siegel RL, Steverding D. (2002) Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by the iron chelator deferoxamine. *Int J Parasitol* 32: 473–479.
- Merschjohann K, Steverding D. (2006) *In vitro* growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense* by iron chelators. *Kinetoplastid Biol Dis* 5: 1–5.
- Lehker MW, Arroyo R, Alderete JF. (1991) The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med* 174: 311–318.
- Melo-Braga M, Rocha-Azevedo R, Silva-Filho FC. (2003) *Tritrichomonas foetus*: the role played by iron during parasite interaction with epithelial cells. *Exp Parasitol* 105: 111–120.
- De Jesus JB, Cuervo P, Junqueira M, Britto C, Silva-Filho FC, et al. (2007) A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics* 7: 1961–1972.
- Breuer W, Epsztejn S, Cabantchik ZI. (1995) Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron (II). *J Biol Chem* 270: 24209–24215.
- Romeo AM, Christen L, Niles EG, Kosman DJ. (2001) Intracellular chelation of iron by bipyridyl inhibits DNA virus replication: ribonucleotide reductase maturation as a probe of intracellular iron pools. *J Biol Chem* 276: 24301–24308.
- Thompson CC, Carabeo RA. (2011) An optimal method of iron starvation of the obligate intracellular pathogen, *Chlamydia trachomatis*. *Front Microbiol* 2: 20.
- Cuervo P, De Jesus JB, Junqueira M, Mendonca-Lima L, González IJ, et al. (2007) Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Biochem Parasitol* 154: 6–21.
- Hunter S, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, et al. (2009) InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res* 37: 211–215.
- Taylor CF, Paton NW, Lilley KS, Binz PA, Julian RK Jr, et al. (2007) The minimum information about a proteomics experiment (MIAPE). *Nat Biotechnol* 25: 887–893.
- Willems E, Leyns L, Vandesompele J. (2008) Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Anal Biochem* 379: 127–129.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622.
- Loo VG, Lalonde RG. (1984) Role of iron in intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 45: 726–730.
- De Jesus JB, Cuervo P, Junqueira M, Britto C, Silva-Filho FC, et al. (2007) A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics* 7: 1961–1972.
- Lee J, Park SJ, Yong TS. (2008) Effect of iron on adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* to CHO cell monolayers. *Korean J Parasitol* 46: 37–40.

32. Salzman TA, Stella AM, De Xifra EAW, Baffle AMDC, Docampo R, et al. (1982) Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: Functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol* 72B: 663–667.
33. Chang CS, Chang KP. (1985) Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* 16: 267–276.
34. Sah JF, Ito H, Kolli BK, Peterson DA, Sassa S, et al. (2002) Genetic rescue of *Leishmania* deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants suitable for analysis of cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy. *J Biol Chem* 277: 14902–14909.
35. Le NTV, Richardson DR. (2002) The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1603: 31–46.
36. Rodvien R, Tavassoli M, Crosby WH. (1974) The structure of spleen in experimentally induced iron deficiency anaemia. *Am J Pathol* 75: 243–254.
37. Jarvis JH, Jacobs A. (1974) Morphological abnormalities in lymphocyte mitochondria associates with iron deficiency anaemia. *J Clin Pathol* 27: 973–979.
38. Levi S, Rovida E. (2009) The role of iron in mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* 1790: 629–636.
39. Yoon YS, Byun HO, Cho H, Kim BK, Toon G. (2003) Complex II defect via down regulation of iron-sulfur subunit induces mitochondrial dysfunction and cell cycle delay in iron chelation-induced senescence associated growth arrest. *J Biol Chem* 278: 51577–51586.
40. Mehta A, Shaha C. (2004) Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition. Complex inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem* 279: 11798–11813.
41. Ly JD, Grubb DR, Lawen A. (2003) The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8: 115–128.
42. Mitra B, Cortez M, Haydock A, Ramasamy G, Myler PJ, et al. (2013) Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. *J Exp Med* 210: 401–416.
43. Proto WR, Coombs GH, Mottram JC. (2013) Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nat Rev Microbiol* 11: 58–66.
44. Li S, Crooks PA, Wei X, de Leon J. (2004) Toxicity of dipyrindyl compounds and related compounds. *Crit Rev Toxicol* 34: 447–460.
45. Livnat-Levanon N, Glickman MH. (2011) Ubiquitin-proteasome system and mitochondria – reciprocity. *Biochim Biophys Acta* 1809: 80–87.
46. Shang F, Taylor A. (2011) Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 51: 5–16.
47. Subota I, Rotureau B, Blisnick T, Ngwabyt S, Durand-Dubief M, et al. (2011) ALBA proteins are stage-regulated during *Trypanosome* development in the tsetse fly and participate in differentiation. *Mol Biol Cell* 22: 4205–4219.
48. Mani J, Güttinger A, Schimanski B, Heller M, Acosta-Serrano A, et al. (2011) Alba-domain proteins of *Trypanosoma brucei* are cytoplasmic RNA-binding proteins that interact with the translation machinery. *PLOS One* 6: 1–16.
49. DiPetrillo CG, Smith EF. (2010) Pcdp1 is a central apparatus protein that binds Ca^{2+} -calmodulin and regulates ciliary motility. *J Cell Biol* 89: 601–612.
50. Eid JE, Sollner-Webb B. (1991) Homologous recombination in the tandem calmodulin genes of *Trypanosoma brucei* yields multiple products: compensation for deleterious deletions by gene amplification. *Genes Dev* 11: 2024–2032.
51. Lee MG, Chen JF, Ho AW, D'Alesandro PA, Van der Ploeg LH. (1990) A putative flagellar Ca^{2+} -binding protein of the flagellum of trypanosomatid protozoan parasites. *Nucleic Acids Res* 18: 4252.
52. Ridgley E, Webster P, Patton C, Ruben L. (2000) Calmodulin-binding properties of the paraflagellar rod complex from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 109: 195–201.
53. Portman N, Lacombe S, Thomas B, McKean PG, Gull K. (2009) Combining RNA interference mutants and comparative proteomics to identify protein components and dependences in a eukaryotic flagellum. *J Biol Chem* 284: 5610–5619.
54. Grasso JA, Bruno M, Yates MA, Wei L, Epstein PM. (1990) Calmodulin dependence of transferrin receptor recycling in rat reticulocytes. *Biochem J* 266: 261–272.
55. McNicoll F, Drummelsmith J, Müller M, Madore E, Boilard, et al. (2006) A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics* 6: 3567–3581.
56. Haile S, Dupé A, Papadopoulou B. (2008). Deadenylation-independent stage-specific mRNA degradation in *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 36: 1634–1644.
57. Gonçalves RL, Barreto RF, Polycarpo CR, Gadelha FR, Castro SL, et al. (2011). A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr* 43:651–661.
58. Van Hellemond JJ, Tielens AGM. (1998). Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. *Parasitol Today* 14:265–271.

8.2. Proteínas diferencialmente expressas por *L. (V.) braziliensis* cultivada na ausência e na presença de 100 μM do quelante de ferro DIP. As proteínas foram extraídas segundo o método MED-FASP e identificadas por LC-MS/MS.

Anexo 8.2. Proteínas diferencialmente expressas por *L. (V.) braziliensis* cultivada na ausência e na presença de 100 µM do quelante de ferro DIP. As proteínas foram extraídas segundo o método MED-FASP e identificadas por LC-MS/MS.

MC (pmol/mg)	Antilog2 MC	MT (pmol/mg)	Antilog2 MT	T/C	Teste T (C vs T)	p valor C vs T	ID (PMA)	Nome da proteína	CS [%]	MM [kDa]	Score	Proteína total A1	Proteína total A2	Proteína total A3	Proteína total A4	Proteína total A5	Proteína total B1	Proteína total B2	Proteína total B3	Proteína total B4	Proteína total B5
-2,9709022	0,127547	-3,8476456	0,069461	0,544595	+	0,005841	A4H337	Kinesin-like protein	34,2	73,787	120,51	1,03E-05	1,22E-05	1,11E-05	9,96E-06	5,33E-06	4,94E-06	4,24E-06	5,41E-06	6,53E-06	4,78E-06
0,37082906	1,293096	0,7317568	1,66066	1,284251	+	0,005209	A4H372	Uncharacterized protein	45,4	144,97	323,31	1,89E-04	2,11E-04	2,07E-04	2,11E-04	1,75E-04	2,24E-04	2,62E-04	2,13E-04	2,54E-04	2,53E-04
-3,2936614	0,101979	-0,6922111	0,618905	6,068964	+	5,71E-05	A4H387	Uncharacterized protein	26,1	25,359	19,707	3,47E-06	1,86E-06	1,55E-06	4,57E-06	2,54E-06	1,33E-05	2,06E-05	1,48E-05	1,11E-05	2,11E-05
-2,9563546	0,128839	-3,8456638	0,069557	0,539873	+	0,000544	A4H394	Uncharacterized protein	32,9	52,349	134,31	5,79E-06	8,56E-06	5,37E-06	7,85E-06	6,63E-06	3,58E-06	3,23E-06	3,21E-06	3,64E-06	4,71E-06
-3,5601496	0,084779	-3,0312754	0,122319	1,442803	+	0,002394	A4H3E7	Uncharacterized protein	22,2	156,92	101,32	1,31E-05	1,25E-05	1,26E-05	1,49E-05	1,36E-05	2,26E-05	1,80E-05	1,47E-05	2,16E-05	2,03E-05
-3,6423708	0,080082	-2,3454766	0,196762	2,456994	+	0,00752	A4H3F4	Gamma-glutamyl phosphate reductase-like protein	21,4	69,447	58,158	7,74E-06	2,57E-06	4,07E-06	6,45E-06	1,01E-05	1,20E-05	1,60E-05	1,13E-05	1,56E-05	1,41E-05
-3,742997	0,074687	-2,7701944	0,146585	1,96265	+	0,001421	A4H3G6	Uncharacterized protein	20,1	205,39	131,73	1,95E-05	1,49E-05	1,48E-05	1,65E-05	1,20E-05	3,65E-05	4,40E-05	1,95E-05	3,57E-05	2,85E-05
-4,2376378	0,053008	-3,3360946	0,099023	1,868063	+	0,006991	A4H3H4	Uncharacterized protein	13	105	56,069	5,54E-06	6,49E-06	3,08E-06	7,89E-06	6,13E-06	9,68E-06	1,36E-05	9,10E-06	1,04E-05	9,76E-06
0,46011378	1,37565	-0,3328043	0,793992	0,577175	+	8,62E-05	A4H3H7	2-aminoethylphosphonate:pyruvateaminotransferase e-like protein	65,4	41,948	314,04	6,71E-05	5,75E-05	5,21E-05	5,25E-05	6,07E-05	3,83E-05	3,02E-05	3,43E-05	3,68E-05	2,81E-05
0,84087516	1,791136	0,0375426	1,026364	0,573024	+	0,003482	A4H3Q2	Putative pater pan protein	39,2	42,392	212,89	8,87E-05	7,04E-05	6,93E-05	7,64E-05	7,64E-05	5,52E-05	2,79E-05	5,23E-05	3,80E-05	5,13E-05
1,8248716	3,542755	1,0774415	2,11029	0,595664	+	0,003398	A4H3S7	DNA topoisomerase type IB small subunit (EC 5.99.1.2)	66,9	28,948	323,31	8,84E-05	1,12E-04	1,38E-04	8,92E-05	9,29E-05	6,44E-05	8,47E-05	5,16E-05	5,11E-05	5,90E-05
-2,1941132	0,218528	-0,5669651	0,675035	3,089018	+	0,000193	A4H3U2	Surface antigen-like protein (Fragment)	37,3	49,028	323,31	9,13E-06	9,03E-06	1,88E-05	1,16E-05	7,86E-06	3,88E-05	6,33E-05	2,89E-05	3,77E-05	2,59E-05
0,5132719	1,427283	-0,2355739	0,849347	0,595079	+	0,000191	A4H3U9	Uncharacterized protein	43,7	50,553	323,31	8,41E-05	6,69E-05	8,41E-05	6,96E-05	5,99E-05	3,69E-05	4,68E-05	4,30E-05	4,19E-05	4,68E-05
-1,7132244	0,304978	1,6578708	3,155505	10,34667	+	1,36E-07	A4H3V1	Putative beta-fructofuranosidase (EC 3.2.1.26)	50,2	71,988	323,31	1,92E-05	2,34E-05	2,91E-05	1,53E-05	2,55E-05	2,45E-04	2,65E-04	2,26E-04	2,42E-04	1,70E-04
3,6141784	12,24549	3,9849426	15,83388	1,293038	+	0,002475	A4H3W2	Uncharacterized protein	79,7	39,067	323,31	4,87E-04	5,48E-04	4,40E-04	6,62E-04	4,61E-04	6,63E-04	5,27E-04	6,25E-04	6,00E-04	6,87E-04
6,5598042	94,34043	6,1359466	70,32407	0,745429	+	0,001054	A4H3W7	60S ribosomal protein L11 (L5, L16)	84	21,589	248,37	2,25E-03	2,00E-03	1,74E-03	2,04E-03	2,20E-03	1,68E-03	1,35E-03	1,54E-03	1,46E-03	1,58E-03
-1,3367322	0,395916	-0,9252932	0,526573	1,330012	+	0,003715	A4H3X2	Putative huntingtin interacting protein (HIP)	30,2	112,25	323,31	4,77E-05	4,43E-05	3,79E-05	4,35E-05	4,97E-05	6,35E-05	5,59E-05	5,26E-05	5,50E-05	7,02E-05
3,7521588	13,47449	2,9378792	7,66284	0,568692	+	0,000328	A4H3Y0	Uncharacterized protein	58	23,224	323,31	3,06E-04	3,18E-04	3,03E-04	3,12E-04	3,28E-04	2,16E-04	1,61E-04	2,12E-04	1,31E-04	1,86E-04
-0,6254414	0,648221	-2,25288	0,209021	0,322453	+	0,000118	A4H401	Uncharacterized protein	47,5	16,569	64,689	7,96E-06	1,21E-05	1,76E-05	8,74E-06	9,61E-06	2,95E-06	4,30E-06	3,16E-06	3,01E-06	4,10E-06
-1,519543	0,348796	-2,3231308	0,199833	0,572923	+	0,003969	A4H403	Uncharacterized protein	51,1	79,762	309,87	3,12E-05	3,34E-05	3,34E-05	2,09E-05	1,12E-05	1,12E-05	1,95E-05	1,95E-05	1,81E-05	1,70E-05
2,2063388	4,615026	1,5450574	2,918157	0,632316	+	0,000184	A4H414	Uncharacterized protein	56,4	32,591	295,18	1,34E-04	1,54E-04	1,57E-04	1,29E-04	1,84E-04	9,70E-05	9,45E-05	1,06E-04	9,18E-05	8,75E-05
0,47188672	1,386922	1,1386185	2,201701	1,587473	+	0,002404	A4H464	Putative dihydropolpoamide branched chain transacylase (EC 2.3.1.-)	47,8	49,533	323,31	7,18E-05	7,99E-05	6,07E-05	7,07E-05	6,26E-05	1,29E-04	9,87E-05	1,39E-04	8,34E-05	1,04E-04
0,60643046	1,522488	0,1055768	1,075924	0,706688	+	0,001974	A4H4C7	Uncharacterized protein	52,9	69,033	323,31	8,38E-05	1,13E-04	1,04E-04	1,08E-04	1,20E-04	7,78E-05	8,17E-05	6,63E-05	6,71E-05	7,98E-05
1,928583	3,806811	3,0440578	8,248077	2,166663	+	0,000119	A4H4D2	Surface antigen-like protein	32,6	30,792	219,96	1,06E-04	1,23E-04	1,47E-04	1,35E-04	8,57E-05	2,69E-04	2,71E-04	2,10E-04	2,38E-04	2,90E-04
-2,1004352	0,233188	-3,1213642	0,114915	0,492799	+	0,000408	A4H4D5	Putative paraflagellar rod protein	25,5	103,95	124,35	1,82E-05	3,07E-05	2,00E-05	3,09E-05	2,42E-05	1,13E-05	9,81E-06	1,33E-05	1,24E-05	1,35E-05
-1,4391897	0,368774	-2,8556884	0,13815	0,37462	+	0,000142	A4H4E3	Putative NADH-ubiquinone oxidoreductase,mitochondrial (EC 1.6.99.3)	41,4	54,473	181,03	1,36E-05	2,07E-05	2,77E-05	2,14E-05	1,97E-05	6,98E-06	9,79E-06	8,80E-06	6,51E-06	6,20E-06
-0,436729	0,738808	0,6935479	1,617256	2,189008	+	2,34E-05	A4H4F4	Putative double-strand-break repair protein rad21 homolog	48,1	60,467	236,33	4,68E-05	3,72E-05	4,42E-05	5,83E-05	3,96E-05	1,13E-04	9,16E-05	9,76E-05	1,02E-04	8,72E-05
1,474	2,77791	2,6130176	6,11782	2,20231	+	7,28E-05	A4H4G6	Surface antigen like protein	31	30,198	125,27	6,94E-05	7,86E-05	9,04E-05	1,02E-04	8,21E-05	1,69E-04	1,43E-04	1,82E-04	2,14E-04	2,28E-04
3,3853468	10,44939	3,9450208	15,40173	1,473936	+	0,000759	A4H4H8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	52,9	20,225	323,31	2,15E-04	2,09E-04	2,12E-04	2,21E-04	2,02E-04	3,82E-04	3,17E-04	3,28E-04	2,44E-04	3,01E-04
-1,7502046	0,29726	-1,0971209	0,467448	1,572526	+	0,006576	A4H4K4	Uncharacterized protein	26,8	98,668	171,1	3,82E-05	2,83E-05	2,41E-05	3,46E-05	2,41E-05	4,34E-05	4,24E-05	3,86E-05	4,73E-05	6,22E-05
-3,5761402	0,083844	-2,334786	0,198225	2,364203	+	0,000586	A4H4L2	ATP-NAD kinase-like protein (EC 2.7.1.23)	25,1	134,4	136,03	1,24E-05	8,87E-06	1,53E-05	1,50E-05	7,13E-06	2,45E-05	3,03E-05	2,89E-05	2,45E-05	2,66E-05
3,1772962	9,046102	2,8258998	7,990561	0,738325	+	0,001831	A4H4M2	Putative deoxyuridine triphosphatase (EC 3.6.1.23)	59	30,581	323,31	2,96E-04	2,90E-04	2,68E-04	2,35E-04	2,99E-04	2,25E-04	2,35E-04	2,02E-04	2,05E-04	2,19E-04
-0,2023857	0,869112	0,0692356	1,049161	1,207164	+	0,002643	A4H4N0	Putative lanosterol synthase (EC 5.4.99.8)	51,7	113,46	323,31	9,61E-05	9,52E-05	9,66E-05	1,06E-04	1,01E-04	1,16E-04	1,36E-04	1,09E-04	1,14E-04	1,21E-04
0,95376966	1,936927	1,251096	2,380222	1,228865	+	0,000816	A4H4N1	Uncharacterized protein	39,7	68,171	268,3	1,32E-04	1,27E-04	1,30E-04	1,25E-04	1,47E-04	1,56E-04	1,69E-04	1,51E-04	1,59E-04	1,76E-04
-1,6947568	0,308907	-1,0557361	0,481052	1,557272	+	0,004011	A4H4S1	Uncharacterized protein	54,8	68,391	201,86	1,59E-05	2,44E-05	1,88E-05	2,49E-05	2,32E-05	2,84E-05	4,08E-05	3,11E-05	3,66E-05	2,93E-05
-2,9139302	0,132684	-1,7482294	0,297667	2,243422	+	0,003435	A4H4S4	Uncharacterized protein	17	34,911	46,112	5,07E-06	4,88E-06	3,30E-06	5,05E-06	5,17E-06	5,80E-06	1,03E-05	9,61E-06	1,23E-05	1,72E-05
-5,2802106	0,025733	-1,5501825	0,341467	13,26937	+	0,000216	A4H4T8	Putative pteridine transporter	13	71,607	23,742	2,95E-06	3,15E-06	0,00E+00	6,62E-07	4,00E-06	2,28E-05	4,06E-05	3,14E-05	1,82E-05	1,64E-05
0,76851486	1,703515	0,3494459	1,274071	0,747907	+	0,00138	A4H4X5	Uncharacterized protein	48,3	89,794	323,31	1,70E-04	1,57E-04	1,58E-04	1,38E-04	1,46E-04	1,29E-04	1,21E-04	9,71E-05	1,10E-04	1,16E-04
2,0750784	4,213673	2,485834	5,601581	1,329382	+	0,006295	A4H4X6	Uncharacterized protein	76,3	89,83	323,31	3,68E-04	3,28E-04	4,25E-04	4,47E-04	3,36E-04	5,25E-04	5,40E-04	4,73E-04	5,57E-04	4,32E-04
-2,0750698	0,237324	-1,519232	0,348872	1,470022	+	0,004551	A4H4Y5	Uncharacterized protein	33,7	93,149	149,76	2,25E-05	2,78E-05	1,96E-05	2,03E-05	2,13E-05	3,58E-05	3,47E-05	2,41E-05	3,70E-05	3,26E-05
-0,8205067	0,566243	-0,1679304	0,890119	1,571973	+	0,003311	A4H4Y7	Uncharacterized protein	42,2	57,959	84,083	3,09E-05	3,38E-05	2,82E-05	3,78E-05	3,43E-05	3,74E-05	6,09E-05	4,98E-05	4,93E-05	6,55E-05
-0,8460254	0,556315	0,0022494	1,00156	1,800347	+	0,00152	A4H502	QA-SNARE protein putative	76,3	27,457	227,88	1,58E-05	2,16E-05	1,57E-05	1,03E-05	1,51E-05	2,86E-05	2,35E-05	2,88E-05	2,76E-05	2,93E-05
1,425649	2,686353	0,4814733	1,396169	0,519726	+	0,000207	A4H507	Uncharacterized protein	69,3	51,682	282,55	1,35E-04	1,80E-04	1,12E-04	1,41E-04	1,34E-04	6,63E-05	7,09E-05	9,37E-05	6,31E-05	7,10E-05
1,2970194	2,457207	0,3627247	1,285852	0,523298	+	0,000594	A4H510	Putative electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase (EC 1.5.5.1)	61,7	62,991	323,31	1,61E-04	1,91E-04	1,35E-04	1,58E-04	1,35E-0					

-5,9028288	0,016714	-4,1206704	0,057485	3,439404	+	0,000587	A4H5W1	Uncharacterized protein	7,3	61,596	6,1949	8,51E-07	1,14E-06	5,54E-07	1,22E-06	1,77E-06	3,23E-06	4,03E-06	2,39E-06	4,68E-06	3,83E-06
-0,2118435	0,863433	1,1836772	2,27155	2,630835	+	0,000211	A4H5X0	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog, mitochondrial	56,7	21,229	82,179	1,83E-05	2,42E-05	1,94E-05	1,66E-05	1,45E-05	4,33E-05	3,91E-05	4,56E-05	4,29E-05	7,88E-05
-2,6014738	0,16477	-4,3089764	0,050451	0,30619	+	0,004139	A4H5X1	Uncharacterized protein	16,5	46,344	144,74	1,23E-05	1,05E-05	6,09E-06	3,89E-06	8,49E-06	3,01E-06	1,58E-06	4,85E-06	1,75E-06	1,72E-06
-2,2810304	0,205751	-1,2141789	0,431018	2,094857	+	0,001171	A4H5Y5	Phosphate-Represible Phosphate Permease-like protein	13,2	52,386	186,58	1,85E-05	8,65E-06	9,06E-06	9,31E-06	1,08E-05	2,35E-05	2,14E-05	2,72E-05	1,97E-05	2,17E-05
-3,6569442	0,079278	-6,4745162	0,00979	0,123487	+	0,00042	A4H5Z1	Dehydrogenase-like protein	27,7	48,019	156,07	4,46E-06	7,73E-06	1,49E-06	3,88E-06	4,01E-06	5,34E-07	0,00E+00	2,55E-07	3,28E-07	0,00E+00
-1,9222954	0,263834	-0,964122	0,152159	1,942849	+	2,38E-05	A4H5Z8	Putative nucleoside phosphatase (EC 3.6.1.4.2)	35,2	74,839	168,07	1,59E-05	1,82E-05	2,01E-05	2,11E-05	2,45E-05	3,58E-05	3,68E-05	3,84E-05	4,06E-05	4,04E-05
1,03905786	2,054885	1,3025256	2,466603	1,20036	+	0,000473	A4H601	Putative mitogen-activated protein kinase	53,6	46,456	307,99	1,03E-04	9,89E-05	9,53E-05	8,88E-05	1,03E-05	1,10E-04	1,16E-04	1,17E-04	1,20E-04	1,10E-04
-1,9680272	0,255602	-2,9564514	0,128831	0,504028	+	0,002986	A4H613	Uncharacterized protein	34,2	82,2	208,32	2,05E-05	2,05E-05	2,16E-05	2,40E-05	1,88E-05	6,81E-06	1,67E-05	8,23E-06	1,13E-05	1,25E-05
-0,8043038	0,572638	-1,7019576	0,307369	0,536759	+	0,00076	A4H617	Putative folate/biopterin transporter	28,6	76,06	253,25	3,80E-05	4,81E-05	4,53E-05	5,30E-05	3,57E-05	1,80E-05	2,87E-05	2,00E-05	2,38E-05	2,84E-05
-0,736088	0,600365	0,0790527	1,056324	1,75947	+	0,006197	A4H630	GP63-3 protein (EC 3.4.24.36)	33	67,02	82,634	3,84E-05	3,26E-05	5,70E-05	5,17E-05	2,85E-05	5,83E-05	8,88E-05	7,14E-05	6,07E-05	7,92E-05
-4,7856122	0,036257	-2,9933478	0,125578	3,463581	+	0,000373	A4H635	GP63-4 protein (EC 3.4.24.36)	29,5	66,568	31,725	2,72E-06	1,42E-06	2,61E-06	1,96E-06	4,12E-06	7,55E-06	7,89E-06	1,22E-05	9,22E-06	6,08E-06
4,6355348	24,85622	4,008869	16,09866	0,647672	+	4,66E-05	A4H638	GP63, leishmanolysin (EC 3.4.24.36)	41,6	62,681	323,31	1,60E-03	1,54E-03	1,58E-03	1,64E-03	1,44E-03	9,36E-04	1,17E-03	8,78E-04	1,04E-03	1,05E-03
5,4459306	43,59016	5,0636666	33,44379	0,767233	+	0,00119	A4H643	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] (EC 1.1.1.8)	76,3	39,422	323,31	1,67E-03	1,61E-03	1,82E-03	1,69E-03	1,81E-03	1,36E-03	1,44E-03	1,19E-03	1,47E-03	1,16E-03
-0,6095408	0,655405	0,1572723	1,115177	1,701507	+	0,000527	A4H662	AAT20 protein	19	53,271	132,74	3,45E-05	4,92E-05	3,01E-05	3,09E-05	3,29E-05	6,19E-05	5,95E-05	5,21E-05	6,40E-05	6,02E-05
1,681297	3,207161	0,4276678	1,345057	0,419392	+	0,001786	A4H674	Uncharacterized protein	71,4	22,598	323,31	6,10E-05	6,49E-05	8,32E-05	7,36E-05	8,25E-05	3,95E-05	1,68E-05	2,88E-05	4,81E-05	2,82E-05
-1,6392088	0,321032	-2,353771	0,195634	0,60939	+	0,000229	A4H678	Uncharacterized protein	23	172,05	118,66	5,60E-05	5,68E-05	4,94E-05	6,42E-05	5,11E-05	3,89E-05	2,83E-05	3,68E-05	2,94E-05	3,61E-05
3,1637026	8,961266	3,7153972	13,13548	1,465806	+	0,001316	A4H697	Uncharacterized protein	24,9	19,264	114,61	1,79E-04	2,02E-04	1,85E-04	1,40E-04	1,64E-04	2,41E-04	3,02E-04	2,37E-04	2,61E-04	2,31E-04
-2,3213174	0,200085	-3,6069328	0,082074	0,410196	+	0,006371	A4H6B1	Uncharacterized protein	29,1	34,219	119,09	8,19E-06	6,17E-06	1,05E-05	5,95E-06	4,80E-06	2,63E-06	5,14E-06	3,79E-06	1,91E-06	1,78E-06
0,8222855	1,768205	1,3752282	2,594089	1,467075	+	0,00462	A4H6B6	Uncharacterized protein	54,7	35,464	323,31	6,22E-05	7,70E-05	5,52E-05	5,78E-05	6,36E-05	9,30E-05	7,34E-05	1,17E-04	1,01E-04	8,19E-05
-1,4038035	0,377931	-4,8574206	0,034496	0,091276	+	0,000209	A4H6C4:A4	Putative fatty acid desaturase (EC 1.14.19.1)	15,7	45,267	26,75	1,03E-05	1,76E-05	1,80E-05	2,35E-05	1,92E-05	1,08E-06	0,00E+00	4,51E-06	2,81E-06	8,35E-07
-0,4302629	0,742127	0,8919699	1,855708	2,500528	+	0,001273	A4H6C7	Uncharacterized protein	57,7	35,455	153,86	2,01E-05	2,80E-05	2,56E-05	3,73E-05	2,36E-05	4,88E-05	9,20E-05	5,54E-05	4,91E-05	1,01E-04
-1,2859975	0,410087	-2,2620784	0,208471	0,508359	+	0,005147	A4H6F5	Uncharacterized protein	41,1	124,38	239,05	9,07E-05	4,78E-05	3,46E-05	4,96E-05	4,63E-05	2,44E-05	2,72E-05	2,00E-05	2,73E-05	3,27E-05
3,5668478	11,85027	3,7894092	13,82693	1,166803	+	0,004797	A4H6I4	Uncharacterized protein	71,6	100,57	323,31	1,17E-03	1,14E-03	1,29E-03	1,18E-03	1,16E-03	1,55E-03	1,26E-03	1,41E-03	1,42E-03	1,33E-03
5,1138636	34,62791	5,6804888	51,28585	1,481055	+	1,3E-05	A4H6I8	Putative aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	81,8	57,261	323,31	2,00E-03	1,88E-03	2,22E-03	1,98E-03	1,85E-03	2,78E-03	2,90E-03	3,25E-03	2,89E-03	2,87E-03
-3,0020558	0,124822	-4,8596202	0,034444	0,275942	+	0,000947	A4H6J0	Uncharacterized protein	8,2	70,736	7,747	1,09E-05	1,71E-05	3,87E-06	7,35E-06	1,01E-05	2,56E-06	2,22E-06	2,18E-06	2,32E-06	2,98E-06
-0,8370593	0,559783	-2,979386	0,126799	0,226514	+	1,98E-05	A4H6J1	Uncharacterized protein	16,7	72,475	61,375	4,63E-05	3,96E-05	2,44E-05	5,51E-05	4,45E-05	9,11E-06	7,58E-06	8,98E-06	8,06E-06	1,31E-05
3,9407562	15,35627	3,4635232	11,03124	0,718354	+	0,005973	A4H6K6	Uncharacterized protein	78,4	49,563	323,31	6,59E-04	6,91E-04	1,04E-03	6,99E-04	7,74E-04	5,46E-04	5,70E-04	4,80E-04	5,73E-04	5,71E-04
2,3401978	5,063721	3,0564566	8,319268	1,642916	+	1,83E-05	A4H6L4	Uncharacterized protein	63,3	37,228	177,32	1,90E-04	1,93E-04	2,14E-04	1,88E-04	1,61E-04	3,33E-04	2,99E-04	3,33E-04	3,33E-04	3,03E-04
5,8316586	56,95137	5,611805	48,90144	0,858653	+	0,006974	A4H6M6	Putative pyruvate phosphate dikinase (EC 2.7.9.1)	85,7	100,63	323,31	6,04E-03	5,20E-03	5,86E-03	6,02E-03	5,58E-03	4,64E-03	5,41E-03	4,56E-03	4,92E-03	5,12E-03
-1,822142	0,282801	-1,1654308	0,445831	1,576485	+	0,000392	A4H6M7	Putative inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) 5-phosphatase (EC 3.1.3.56)	32,1	50,845	127,99	1,57E-05	1,34E-05	1,58E-05	1,58E-05	1,17E-05	1,94E-05	2,15E-05	2,27E-05	2,49E-05	2,58E-05
-3,959806	0,064266	-3,2914032	0,102138	1,589312	+	0,002553	A4H6P8	Putative ABC transporter	12,8	197,67	55,096	1,13E-05	1,14E-05	1,51E-05	1,34E-05	1,26E-05	2,13E-05	2,06E-05	2,06E-05	1,45E-05	2,58E-05
-3,853388	0,069185	-2,3136258	0,201154	2,907466	+	0,00244	A4H6Q5	Uncharacterized protein	17,6	68,196	26,007	2,48E-06	6,49E-06	7,58E-06	5,04E-06	3,81E-06	1,46E-05	1,42E-05	1,11E-05	9,45E-06	2,21E-05
-1,9911132	0,251545	-3,4305212	0,092749	0,368719	+	0,005933	A4H6S4	Uncharacterized protein	51,7	22,974	109,12	8,80E-06	6,30E-06	5,13E-06	3,48E-06	6,54E-06	3,48E-06	3,31E-06	1,07E-06	2,11E-06	1,68E-06
2,3451042	5,080971	2,9205946	7,571581	1,490184	+	0,001951	A4H6T7	Putative hydroxycyglutathione hydrolase (EC 3.1.2.6)	73,2	32,917	323,31	1,71E-04	1,61E-04	1,66E-04	1,77E-04	1,62E-04	3,08E-04	2,10E-04	2,64E-04	1,97E-04	2,85E-04
-3,5933194	0,082852	-6,7202058	0,009485	0,114476	+	0,000671	A4H6U3	Putative ornithine decarboxylase (EC 4.1.1.17)	13,2	69,884	47,842	5,61E-06	8,02E-06	2,73E-06	1,25E-05	4,25E-06	1,76E-06	3,62E-07	3,47E-07	9,84E-07	5,90E-07
-3,877379	0,068044	-2,9859566	0,126223	1,855004	+	0,001228	A4H6V3	PUF4 protein	21,1	151,33	130,23	1,01E-05	1,27E-05	1,01E-05	1,03E-05	8,66E-06	1,34E-05	2,45E-05	1,81E-05	1,79E-05	2,39E-05
-0,8708413	0,546828	-0,058598	0,960197	1,75594	+	0,002272	A4H6W0	Uncharacterized protein	30,6	104,02	188,78	6,28E-05	5,90E-05	4,48E-05	5,51E-05	6,50E-05	8,17E-05	1,13E-04	1,42E-04	9,70E-05	7,84E-05
-1,42239	0,373094	0,3646395	1,28756	3,451036	+	0,000108	A4H6W3	Uncharacterized protein	54,5	12,044	54,91	1,55E-06	4,01E-06	5,40E-06	6,30E-06	2,60E-06	1,37E-05	2,03E-05	1,69E-05	1,52E-05	1,25E-05
-1,2571792	0,418361	-2,8533352	0,138376	0,330757	+	0,000588	A4H6W6	Uncharacterized protein	40,2	109,14	218,2	4,76E-05	5,13E-05	3,88E-05	4,86E-05	4,29E-05	1,19E-05	3,11E-05	1,15E-05	1,10E-05	1,68E-05
-1,9843674	0,252724	-1,029057	0,49003	1,938997	+	0,000153	A4H6X7	Uncharacterized protein	42,4	65,661	102,67	1,78E-05	1,79E-05	1,35E-05	2,16E-05	1,37E-05	2,89E-05	3,07E-05	3,26E-05	3,73E-05	3,20E-05
4,2984576	19,67726	3,6730504	12,75553	0,648237	+	0,000376	A4H6Y0	Cytochrome c oxidase subunit IV (EC 1.9.3.1)	82,4	39,126	323,31	7,17E-04	6,51E-04	9,73E-04	7,63E-04	7,82E-04	5,19E-04	5,42E-04	5,09E-04	4,52E-04	4,76E-04
3,5019038	11,32865	4,1254176	17,45317	1,540623	+	0,000321	A4H6Z3	Putative NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	62,3	41,06	323,31	4,57E-04	4,16E-04	4,98E-04	5,39E-04	4,33E-04	6,73E-04	8,80E-04	7,28E-04	6,76E-04	6,50E-04
-3,3329404	0,09924	-2,353219	0,195709	1,972085	+	3,65E-05	A4H702	Uncharacterized protein	18,8	150,05	98,325	1,38E-05	1,64E-05	1,20E-05	1,47E-05	1,84E-05	2,95E-05	2,69E-05	2,94E-05	2,74E-05	3,41E-05
-1,6618898	0,316025	-1,0154909	0,49466	1,565256	+	0,000432	A4H709	Uncharacterized protein	31,2	70,831	168,74	2,31E-05	2,34E-05	1,86E-05	2,31E-05	2,42E-05	2,96E-05	3,99E-05	3,64E-05	3,10E-05	3,96E-05
4,7657824	27,20467	5,273383	38,67644	1,421864	+	0,000346	A4H716	Putative carboxypeptidase	75,7	57,509	323,31	1,65E-03	1,55E-03	1,38E-03	1,71E-03	1,56E-03	2,09E-03	1,96E-03	2,38E-03	2,20E-03	2,54E

1,3091876	2,47802	0,6484627	1,567497	0,63256	+	0,002505	A4H7R5	Kinesin-like protein	82,7	223,43	323,31	5,29E-04	5,11E-04	7,21E-04	5,57E-04	4,80E-04	3,39E-04	3,78E-04	4,06E-04	3,86E-04	2,62E-04
-1,7006274	0,307652	-1,2197308	0,429363	1,395611	+	0,002918	A4H7T1	Tyrosine phosphatase isoform (EC 3.1.3.48)	24,7	66,495	110,08	2,14E-05	2,32E-05	2,19E-05	1,77E-05	1,86E-05	2,62E-05	2,65E-05	3,22E-05	2,51E-05	3,39E-05
3,484461	11,1925	2,8395468	7,157952	0,639531	+	1,82E-05	A4H7T3;A4	Uncharacterized protein	72,9	37,161	323,31	3,60E-04	4,31E-04	4,76E-04	4,15E-04	4,06E-04	2,59E-04	2,55E-04	2,70E-04	2,61E-04	2,86E-04
-1,1713556	0,444004	-0,3673139	0,775225	1,745986	+	0,001844	A4H7T9	Bifunctional NAD(P)H-hydrate repair enzyme	49,4	58,658	280,74	1,91E-05	2,58E-05	2,25E-05	3,06E-05	3,53E-05	3,92E-05	4,48E-05	4,90E-05	4,22E-05	5,37E-05
1,2922408	2,449082	1,8021536	3,487404	1,423964	+	0,006323	A4H7U1	Uncharacterized protein	79,9	30,724	169,95	8,66E-05	7,55E-05	7,15E-05	7,07E-05	7,29E-05	8,77E-05	1,26E-04	9,88E-05	9,38E-05	1,39E-04
1,8831632	3,68883	2,4555858	5,458358	1,487019	+	0,000897	A4H7V6	INO1 protein (EC 5.5.1.4)	52,3	58,283	323,31	2,28E-04	2,27E-04	2,55E-04	2,02E-04	1,73E-04	3,16E-04	3,66E-04	2,83E-04	3,22E-04	3,17E-04
-3,3383154	0,098871	-2,5431518	0,171568	1,735274	+	0,006408	A4H7W7	Uncharacterized protein	32	56,884	22,658	7,00E-06	4,89E-06	4,71E-06	7,65E-06	4,58E-06	7,86E-06	1,32E-05	1,13E-05	7,61E-06	9,94E-06
-1,9151532	0,265144	-3,1790914	0,110407	0,416406	+	0,00169	A4H7X6	Uncharacterized protein	36,3	114,35	323,31	2,47E-05	2,82E-05	2,20E-05	3,44E-05	4,86E-05	1,10E-05	2,07E-05	1,17E-05	1,20E-05	9,98E-06
-0,1582851	0,89609	-0,8792313	0,543657	0,606699	+	0,001521	A4H7Y3	Putative ATP-dependent RNA helicase	48	76,618	323,31	7,37E-05	7,37E-05	4,57E-05	8,04E-05	7,64E-05	3,84E-05	4,44E-05	4,22E-05	4,02E-05	4,33E-05
-1,4580086	0,363995	-2,1069092	0,232144	0,637766	+	0,005753	A4H806	Putative ecotin	29,4	80,516	116,7	3,04E-05	3,68E-05	2,58E-05	2,69E-05	2,78E-05	2,13E-05	1,70E-05	2,12E-05	1,31E-05	2,28E-05
1,7444356	3,350637	2,273138	4,833734	1,442631	+	0,003347	A4H817	Uncharacterized protein	60,1	98,732	323,31	3,82E-04	2,64E-04	2,95E-04	4,10E-04	3,25E-04	4,65E-04	4,56E-04	5,05E-04	5,35E-04	4,31E-04
-0,8345954	0,56074	0,6932842	1,61696	2,883617	+	0,000517	A4H824	Ecotin-like protein 3	44,3	34,527	219,83	1,19E-05	1,70E-05	2,38E-05	2,82E-05	2,00E-05	4,51E-05	4,18E-05	4,16E-05	6,15E-05	5,73E-05
-0,5777144	0,670024	-1,1255955	0,458313	0,684024	+	0,001864	A4H836	Uncharacterized protein	36	97,485	323,31	6,45E-05	6,93E-05	6,90E-05	6,22E-05	6,21E-05	3,93E-05	5,91E-05	3,73E-05	4,47E-05	4,59E-05
-0,198291	0,871582	-1,4324855	0,370492	0,42508	+	0,000258	A4H838	Uncharacterized protein	72,1	24,263	128,6	2,62E-05	1,88E-05	2,15E-05	2,17E-05	1,83E-05	6,13E-06	8,29E-06	8,70E-06	1,03E-05	1,28E-05
0,81185624	1,755469	0,3551511	1,27912	0,728648	+	0,005392	A4H843	Uncharacterized protein	39,7	60,778	250,72	1,06E-04	1,08E-04	1,06E-04	1,03E-04	1,11E-04	6,73E-05	1,07E-04	6,94E-05	7,50E-05	7,59E-05
3,5221046	11,48839	2,7588256	6,768451	0,589156	+	0,000773	A4H872	Putative succinate dehydrogenase	71,2	21,189	223,19	2,62E-04	2,04E-04	2,46E-04	2,28E-04	2,85E-04	1,53E-04	1,24E-04	1,24E-04	1,34E-04	1,92E-04
-1,3867729	0,382419	0,918291	1,889875	4,941893	+	2,47E-06	A4H877	TRYP1 protein	15,9	22,503	151,74	6,11E-06	9,75E-06	1,30E-05	8,40E-06	7,23E-06	4,09E-05	4,88E-05	3,87E-05	4,09E-05	4,39E-05
-0,5660822	0,675449	-2,0641032	0,239135	0,354039	+	0,002293	A4H878	Putative developmentally regulated protein	81,5	123,268	2,5657	1,10E-05	8,66E-06	4,71E-06	1,07E-05	1,21E-05	6,06E-06	2,73E-06	2,69E-06	2,92E-06	2,46E-06
6,8430138	114,8028	7,485078	179,1567	1,56056	+	3,32E-06	A4H879	Tryptaredoxin peroxidase	82,9	22,572	323,31	2,65E-03	2,51E-03	2,83E-03	2,38E-03	2,61E-03	4,01E-03	4,35E-03	4,07E-03	4,11E-03	3,71E-03
-1,2691998	0,41489	-1,8343706	0,280414	0,675875	+	0,002139	A4H885	Putative inositol/phosphatidylinositol phosphatase	31,1	86,899	169,95	4,14E-05	3,61E-05	3,83E-05	3,76E-05	3,51E-05	2,14E-05	2,80E-05	2,78E-05	1,95E-05	2,64E-05
-0,5745591	0,671491	-0,2775843	0,824971	1,228566	+	0,001448	A4H892	Putative ubiquitin hydrolase	41	142,52	323,31	1,02E-04	1,05E-04	9,42E-05	8,89E-05	8,96E-05	1,06E-04	1,23E-04	1,18E-04	1,20E-04	1,22E-04
0,60886276	1,525057	0,9446514	1,924724	1,262067	+	0,002383	A4H883	Putative phosphomevalonate kinase protein (EC 2.7.4.2)	38,9	48,628	210,35	7,23E-05	6,87E-05	8,02E-05	7,92E-05	7,09E-05	8,49E-05	1,05E-04	8,59E-05	9,16E-05	1,02E-04
1,5242854	2,876442	-2,075445	4,214744	1,465263	+	0,002218	A4H8H4	Putative fucose kinase (EC 2.7.1.52)	43,1	131,95	323,31	3,50E-04	4,10E-04	3,94E-04	4,02E-04	3,45E-04	4,15E-04	5,70E-04	5,53E-04	6,44E-04	6,31E-04
3,326465	10,0315	2,8524346	7,222181	0,71995	+	0,000515	A4H8H8	Uncharacterized protein	58,5	36,404	323,31	3,37E-04	3,56E-04	3,66E-04	3,52E-04	4,21E-04	2,79E-04	2,69E-04	2,89E-04	2,23E-04	2,59E-04
4,2596616	19,15517	3,8258074	10,18021	0,742081	+	0,000342	A4H8I0	Putative orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate phosphoribosyltransferase	78,3	49,708	323,31	8,77E-04	1,05E-03	9,05E-04	1,00E-03	9,33E-04	6,66E-04	6,76E-04	6,80E-04	7,77E-04	7,77E-04
1,5147388	2,857471	1,7345264	3,327702	1,164562	+	0,005738	A4H8I3	Putative carbamoyl-phosphate synthase (EC 6.3.4.16)	54,3	208,6	323,31	6,34E-04	6,13E-04	5,62E-04	5,78E-04	5,95E-04	6,39E-04	7,89E-04	6,81E-04	6,96E-04	6,76E-04
-1,0817248	0,472464	0,1118819	1,080637	2,287238	+	0,001987	A4H8J2	Uncharacterized protein	30,3	89,2	86,275	3,12E-05	3,57E-05	4,29E-05	4,31E-05	6,44E-05	1,02E-04	1,38E-04	1,09E-04	5,95E-05	9,16E-05
4,8143858	28,13679	5,2197104	37,26399	1,324387	+	0,004174	A4H8J8	Transaldolase (EC 2.2.1.2)	58,9	37,068	323,31	1,12E-03	1,05E-03	1,01E-03	1,03E-03	1,01E-03	1,30E-03	1,10E-03	1,59E-03	1,56E-03	1,42E-03
-1,1919374	0,437715	-0,3943673	0,760823	1,738171	+	0,001252	A4H8J9	Uncharacterized protein	42,4	59,733	133,44	2,16E-05	2,40E-05	3,42E-05	2,90E-05	2,38E-05	4,52E-05	5,86E-05	3,60E-05	4,71E-05	4,31E-05
-0,2289259	0,85327	0,353904	1,278014	1,497778	+	0,001225	A4H8M2	Uncharacterized protein	65,9	96,277	323,31	9,23E-05	8,84E-05	7,22E-05	8,83E-05	7,20E-05	1,20E-04	9,99E-05	1,48E-04	1,25E-04	1,26E-04
-0,6920112	0,61899	-0,0800646	0,946015	1,52832	+	0,004405	A4H8P0	Uncharacterized protein	31,4	65,054	56,41	3,42E-05	3,66E-05	5,22E-05	4,96E-05	3,27E-05	6,16E-05	7,34E-05	6,04E-05	5,65E-05	7,15E-05
2,7983534	6,95646	2,0617352	4,174881	0,600144	+	0,002875	A4H8S0	Uncharacterized protein	74,9	39,615	323,31	2,90E-04	2,61E-04	3,49E-04	2,32E-04	2,59E-04	1,66E-04	2,41E-04	1,39E-04	1,57E-04	1,41E-04
1,468504	2,767348	-0,5371634	0,689125	0,24902	+	3,45E-05	A4H8S6	Kinesin-like protein	44,6	114,13	323,31	2,76E-04	3,26E-04	3,16E-04	3,27E-04	3,37E-04	3,80E-05	1,02E-04	1,08E-04	7,87E-05	4,28E-05
-0,8607378	0,550671	-1,3640904	0,388479	0,705465	+	0,003714	A4H8T3	DNA polymerase (EC 2.7.7.7)	39,7	151,83	323,31	8,33E-05	9,42E-05	7,02E-05	9,00E-05	8,25E-05	7,06E-05	6,29E-05	4,61E-05	5,73E-05	6,05E-05
1,3644716	2,57482	1,031571	2,044249	0,793939	+	0,001797	A4H8V8	RAC-B2 protein (EC 4.6.1.1)	38,6	151,36	323,31	4,09E-04	3,83E-04	3,89E-04	4,12E-04	3,59E-04	2,82E-04	3,33E-04	2,76E-04	3,24E-04	3,39E-04
0,69077572	1,614151	-0,1116266	0,925544	0,573394	+	0,003101	A4H8Y5	Uncharacterized protein	32,7	61,249	296,15	1,09E-04	9,40E-05	7,85E-05	1,04E-04	1,14E-04	3,98E-05	4,87E-05	5,78E-05	7,28E-05	7,17E-05
-2,983249	0,12646	-2,5766962	0,167624	1,325515	+	0,006746	A4H8Z0	Uncharacterized protein	23,6	397,92	323,31	5,65E-05	5,90E-05	4,20E-05	4,75E-05	4,87E-05	5,73E-05	7,37E-05	6,41E-05	6,56E-05	7,44E-05
1,2227368	2,33389	1,8550314	3,617596	1,550028	+	0,000162	A4H8Z1	Uncharacterized protein	39,1	59,288	323,31	1,36E-04	1,44E-04	1,23E-04	1,58E-04	1,34E-04	2,25E-04	1,78E-04	2,34E-04	2,08E-04	2,33E-04
-3,729232	0,075403	-6,9540132	0,008066	0,106966	+	5,09E-05	A4H8Z4	Uncharacterized protein	10,8	107,67	25,628	9,94E-06	8,21E-06	1,18E-05	3,77E-06	9,68E-06	8,30E-07	1,15E-06	1,18E-06	4,01E-07	1,10E-06
-3,0698214	0,119094	-4,214869	0,053852	0,452175	+	0,000512	A4H913	Serine/threonine-protein kinase PLK (EC 2.7.11.21) (Polo-like kinase)	27,5	77,894	101,24	1,06E-05	1,07E-05	8,99E-06	1,16E-05	5,81E-06	4,17E-06	3,56E-06	3,85E-06	4,28E-06	5,32E-06
3,0209064	8,116774	2,5704098	5,939781	0,731791	+	0,002682	A4H923	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.205)	81,1	52,019	323,31	3,89E-04	4,81E-04	4,59E-04	4,31E-04	3,63E-04	3,68E-04	2,83E-04	3,28E-04	2,86E-04	2,88E-04
1,251666	2,381162	0,7798501	1,716952	0,721056	+	0,002946	A4H925	Kinesin-like protein	62,8	103,62	323,31	2,59E-04	2,28E-04	2,75E-04	2,13E-04	2,63E-04	1,90E-04	1,75E-04	2,17E-04	1,61E-04	1,55E-04
-1,1343416	0,455543	-0,5466782	0,684595	1,502811	+	0,005447	A4H941	Uncharacterized protein	36,1	61,416	121,08	2,97E-05	2,89E-05	2,65E-05	3,03E-05	2,49E-05	5,10E-05	4,43E-05	2,89E-05	4,90E-05	4,12E-05
-1,7761768	0,291956	-3,2828054	0,102749	0,351933	+	0,004765	A4H986	Uncharacterized protein	39,4	36,565	60,342	1,61E-05	8,55E-06	7,27E-06	8,69E-06	1,59E-05	7,20E-06	5,29E-06	2,75E-06	2,41E-06	2,96E-06
-2,0608152	0,239681	-3,7170764	0,076041	0,31726	+	0,005837	A4H9A0	Uncharacterized protein	63,4	29,847	67,832	7,28E-06	6,07E-06	6,19E-06	1,24E-05	5,53E-06	1,78E-06	4,78E-06	2,53E-06	0,00E+00	2,99E-06
0,98015288	1,972674	1,2416504</																			

-0,3735577	0,771877	-1,5803012	0,334412	0,433245	+	0,000751	A4H9X0	Uncharacterized protein	11,9	28,388	7,4432	2,79E-05	2,71E-05	1,95E-05	2,04E-05	1,68E-05	1,23E-05	7,78E-06	8,70E-06	1,31E-05		
4,4495964	21,85053	4,8014046	27,88475	1,276159	+	3,25E-05	A4H9X2	Putative mitogen-activated protein kinase	86,1	30,742	323,31	6,63E-04	6,50E-04	7,03E-04	6,54E-04	6,86E-04	7,85E-04	8,39E-04	9,00E-04	8,79E-04	8,90E-04	
4,3012484	19,71536	3,8198926	14,1222	0,716304	+	0,007145	A4H9X6	Uncharacterized protein	96,3	18,551	323,31	3,48E-04	4,07E-04	3,77E-04	2,92E-04	4,20E-04	2,60E-04	2,04E-04	2,74E-04	2,88E-04	2,95E-04	
0,2183276	1,163384	-0,3388545	0,790669	0,679628	+	0,000112	A4H9Y0	Uncharacterized protein	50,5	78,328	311,51	8,89E-05	9,35E-05	9,38E-05	8,69E-05	9,21E-05	6,74E-05	6,12E-05	5,01E-05	5,21E-05	7,06E-05	
0,4695997	1,384725	-0,2673445	0,830847	0,600009	+	0,003338	A4H9Y1	Uncharacterized protein	47,6	73,042	323,31	7,50E-05	1,20E-04	1,30E-04	9,40E-05	9,62E-05	5,15E-05	6,78E-05	5,23E-05	5,86E-05	6,68E-05	
1,7623906	3,392598	1,4002958	2,639557	0,778034	+	0,00337	A4H9Z2	Uncharacterized protein	63,5	48,455	323,31	1,47E-04	1,83E-04	1,67E-04	1,57E-04	1,71E-04	1,16E-04	1,16E-04	1,25E-04	1,47E-04	1,39E-04	
-2,9905718	0,12582	-5,51687	0,02184	0,173584	+	0,006738	A4H9Z3	Lipoyl synthase, mitochondrial (EC 2.8.1.8) (Lipoate synthase) (LS) (Lip-syn)	42,5	42,319	116,87	5,15E-06	3,18E-06	7,89E-06	3,45E-06	9,60E-06	1,03E-06	2,11E-06	0,00E+00	3,41E-07		
0,0305034	1,023175	-1,080688	0,472803	0,462094	+	0,006577	A4HA25	Putative U3 snRNA-associated protein UTP11	64,4	41,549	157,06	2,49E-05	5,35E-05	5,85E-05	4,10E-05	4,31E-05	2,99E-05	2,67E-05	1,55E-05	1,66E-05	1,43E-05	
0,56157368	1,475878	-0,4566796	0,728661	0,493714	+	0,000287	A4HA26	Kinesin-like protein	55,1	123,93	323,31	1,54E-04	2,10E-04	1,48E-04	1,68E-04	2,58E-04	1,03E-04	7,71E-05	9,28E-05	8,64E-05	9,47E-05	
-0,6747004	0,626462	-1,4115292	0,375913	0,600057	+	1,67E-05	A4HA40	Kinesin-like protein (Fragment)	68	93,86	323,31	6,30E-05	5,43E-05	6,02E-05	5,77E-05	5,91E-05	3,40E-05	4,03E-05	3,57E-05	3,75E-05	2,99E-05	
-4,0150794	0,06185	-2,9346932	0,130788	2,214602	+	0,003331	A4HA45	Uncharacterized protein	20,9	70,386	60,975	4,11E-06	4,67E-06	4,00E-06	4,56E-06	4,46E-06	5,26E-06	7,29E-06	9,61E-06	1,32E-05	1,35E-05	
1,876004	3,67057	2,2840706	4,870502	1,326906	+	0,002169	A4HA52	4-coumarate:coa ligase-like protein (EC 6.2.1.12)	68,8	60,679	323,31	2,16E-04	2,50E-04	2,04E-04	2,15E-04	2,31E-04	3,42E-04	2,82E-04	3,28E-04	2,73E-04	2,61E-04	
0,03958642	1,027819	0,5291042	1,443033	1,403976	+	0,001431	A4HA53	Uncharacterized protein	52,7	84,45	323,31	9,49E-05	8,57E-05	8,68E-05	9,46E-05	7,42E-05	1,14E-04	1,28E-04	1,03E-04	1,25E-04	1,43E-04	
-2,4654484	0,181061	-3,2629488	0,104173	0,575345	+	0,001498	A4HA57	Uncharacterized protein	27,2	128,13	183,71	2,85E-05	2,12E-05	2,09E-05	2,76E-05	1,93E-05	1,33E-05	1,12E-05	1,10E-05	1,53E-05	1,69E-05	
1,9083316	3,753747	2,8088942	7,007473	1,866794	+	0,000823	A4HA92	CPA protein	44,3	51,97	323,31	2,39E-04	2,31E-04	1,53E-04	1,94E-04	1,71E-04	3,71E-04	3,21E-04	4,19E-04	3,07E-04	3,53E-04	
3,8272166	14,19407	4,4053872	21,19111	1,492955	+	0,000377	A4HAA2	Peptidylprolyl isomerase-like protein (EC 5.2.1.8)	53,7	47,827	323,31	6,66E-04	7,93E-04	5,75E-04	7,30E-04	6,49E-04	1,05E-03	1,06E-03	1,12E-03	8,91E-04	9,68E-04	
-0,0169505	0,98832	0,5337026	1,44764	1,464749	+	0,000346	A4HAA8	Putative ATP-dependent zinc metalloproteinase	54,3	64,783	323,31	6,33E-05	7,40E-05	7,02E-05	5,66E-05	5,80E-05	9,50E-05	9,00E-05	1,08E-04	8,55E-05	9,23E-05	
0,9516934	1,934142	1,7984192	3,478389	1,798415	+	3,37E-05	A4HAB9	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34 (EC 1.1.1.37)	54,7	35,955	323,31	6,58E-05	6,11E-05	6,94E-05	7,04E-05	8,27E-05	1,22E-04	1,45E-04	1,08E-04	1,33E-04	1,19E-04	
-1,870348	0,273507	-1,1939714	0,437098	1,598121	+	0,000626	A4HAF1	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	29,8	121,78	323,31	2,80E-05	3,71E-05	2,84E-05	3,40E-05	4,06E-05	4,90E-05	4,65E-05	5,59E-05	6,00E-05	5,58E-05	
-1,6546506	0,317615	-2,2680174	0,207615	0,653669	+	0,004403	A4HAG2	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	33,4	76,847	138,76	3,09E-05	2,17E-05	2,28E-05	2,30E-05	2,46E-05	1,87E-05	1,58E-05	1,19E-05	1,96E-05	1,51E-05	
-0,4404321	0,736914	-0,0722553	0,95115	1,290721	+	0,002034	A4HAL9	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	38	86,112	323,31	7,49E-05	6,44E-05	6,17E-05	5,50E-05	6,29E-05	8,22E-05	7,59E-05	7,81E-05	8,60E-05	8,74E-05	
0,15593242	1,114141	-0,6699956	0,628509	0,564119	+	0,003558	A4HAM7	DAT protein (EC 2.3.1.42)	36,5	155,84	316,83	1,80E-04	1,87E-04	1,66E-04	1,59E-04	1,77E-04	1,41E-04	1,23E-04	7,31E-05	7,02E-05	1,02E-04	
-1,829615	0,28134	-0,8736979	0,545746	1,939812	+	0,007345	A4HAN5	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	31,1	56,596	199,96	2,40E-05	1,16E-05	1,88E-05	1,49E-05	1,30E-05	2,71E-05	3,93E-05	4,22E-05	2,03E-05		
-5,5721982	0,021018	-6,58624	0,010407	0,495157	+	0,005028	A4HAP3	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34 (EC 2.7.7.7)	5,1	138,29	16,23	3,20E-06	1,98E-06	2,94E-06	3,57E-06	3,11E-06	1,45E-06	1,40E-06	9,11E-07	2,39E-06	1,38E-06	
-1,0547621	0,481377	0,2330706	1,175527	2,442011	+	0,000121	A4HAP7	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	52,6	40,249	99,231	1,81E-05	1,53E-05	2,47E-05	1,80E-05	2,23E-05	3,44E-05	6,03E-05	5,18E-05	4,28E-05	5,15E-05	
-2,3021276	0,202764	-1,8454248	0,278273	1,372402	+	0,003263	A4HAR2	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	38,2	116,39	135,08	2,12E-05	3,06E-05	2,04E-05	2,47E-05	2,23E-05	3,25E-05	3,34E-05	3,48E-05	3,09E-05	3,06E-05	
-1,3633118	0,388689	-2,4190254	0,186982	0,481059	+	0,003863	A4HAR4	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	41,8	18,516	9,7748	9,95E-06	9,15E-06	9,95E-06	6,21E-06	5,76E-06	4,81E-06	4,14E-06	2,58E-06	4,06E-06	2,37E-06	
2,2844826	4,871894	2,8486222	7,203121	1,478505	+	3,92E-05	A4HAU1	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	84,6	35,834	323,31	1,78E-04	1,49E-04	1,78E-04	1,91E-04	1,79E-04	2,50E-04	2,61E-04	2,67E-04	2,75E-04	2,39E-04	
-1,4367993	0,369386	-2,1472856	0,225737	0,611114	+	0,00345	A4HAU8	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	42,2	38,729	43,42	1,05E-05	1,30E-05	1,53E-05	2,00E-05	1,43E-05	9,41E-06	1,02E-05	8,19E-06	7,27E-06	8,94E-06	
-0,2983588	0,813177	0,284602	1,218074	1,49792	+	0,004119	A4HAV3	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34 (EC 2.4.1.132)	51	60,195	323,31	4,27E-05	4,91E-05	3,86E-05	5,91E-05	5,88E-05	6,94E-05	6,37E-05	7,77E-05	8,88E-05	7,00E-05	
2,5183416	5,729231	2,240611	4,725972	0,824888	+	0,003287	A4HAX2	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	70,5	100,24	323,31	5,32E-04	6,27E-04	6,11E-04	5,35E-04	5,73E-04	4,30E-04	5,24E-04	4,73E-04	4,86E-04	4,60E-04	
-0,2852863	0,820579	-2,7464596	1,490116	0,811599	+	3,38E-06	A4HAX3	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	37,2	91,293	46,602	7,68E-05	5,10E-05	9,59E-05	1,04E-04	6,09E-05	1,23E-05	1,35E-05	1,38E-05	1,76E-05	1,17E-05	
1,3422964	2,535546	0,8150549	1,759365	0,69388	+	0,000249	A4HAX4	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	51,5	64,17	323,31	1,75E-04	1,71E-04	1,42E-04	1,49E-04	1,18E-04	1,79E-04	1,18E-04	9,87E-05	1,10E-04	1,21E-04	1,18E-04
5,4539684	43,8337	5,6550626	50,3899	1,14957	+	0,00391	A4HAX5	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	69,7	22,025	323,31	1,05E-03	9,60E-04	9,33E-04	9,47E-04	9,38E-04	1,20E-03	1,03E-03	1,08E-03	1,14E-03	1,10E-03	
-0,2284421	0,853556	-0,7045258	0,613644	0,718927	+	0,00638	A4HAZ8	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	6,9	21,138	329,43	1,74E-05	1,90E-05	1,58E-05	1,81E-05	2,03E-05	1,54E-05	1,46E-05	9,99E-06	1,18E-05	1,38E-05	
0,04798038	1,033817	-0,6742765	0,626646	0,606148	+	0,005342	A4HB20	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	50,2	27,96	313,93	2,60E-05	2,84E-05	3,70E-05	3,09E-05	2,42E-05	1,84E-05	1,21E-05	2,04E-05	2,30E-05	1,59E-05	
-1,0876371	0,470531	-2,0418124	0,242858	0,516137	+	0,000443	A4HB21	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34 (EC 2.7.11.1)	22,7	98,474	143,35	5,25E-05	3,47E-05	5,29E-05	5,03E-05	4,42E-05	2,82E-05	2,10E-05	1,84E-05	2,55E-05	2,81E-05	
3,2071512	9,235251	2,8173614	7,048721	0,763241	+	0,004836	A4HB24	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	57,3	19,978	323,31	1,54E-04	2,04E-04	2,00E-04	2,02E-04	1,69E-04	1,39E-04	1,24E-04	1,36E-04	1,52E-04	1,56E-04	
0,91586078	1,886694	0,2720585	1,20753	0,640024	+	0,000242	A4HB62	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34 (EC 5.99.1.2)	47,6	73,783	323,31	1,40E-04	1,43E-04	1,45E-04	1,37E-04	1,31E-04	1,10E-04	8,91E-05	8,61E-05	7,19E-05	9,17E-05	
-4,8420364	0,034866	-3,9794048	0,063399	1,818352	+	0,002784	A4HB71	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	12,4	218,08	59,163	9,47E-06	8,13E-06	9,48E-06	5,94E-06	5,88E-06	1,29E-05	1,49E-05	1,19E-05	1,90E-05	1,16E-05	
-2,2677816	0,207649	-5,698151	0,019261	0,092759	+	0,000263	A4HBB2	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	18,6	11,683	2,5925	2,28E-06	1,96E-06	2,23E-06	2,64E-06	3,19E-06	0,00E+00	0,00E+00	4,73E-07	0,00E+00	0,00E+00	
-3,5801018	0,083615	-0,8189585	0,566851	6,779333	+	0,000152	A4HBB4	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	32,6	59,346	138,53	4,04E-06	6,92E-06	3,27E-06	6,90E-06	4,77E-06	3,48E-05	8,51E-05	2,27E-05	2,31E-05	2,79E-05	
-0,4163931	0,749296	0,1394566	1,10149	1,470034	+	0,001802	A4HBG8	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	37,3	89,663	323,31	5,29E-05	6,94E-05	6,72E-05	7,91E-05	7,01E-05	9,24E-05	9,13E-05	1,11E-04	8,86E-05	1,14E-04	
4,8927316	29,70701	4,5965298	24,1932	0,814394	+	0,004291	A4HBM3	Hexokinase (EC 2.7.1.1)	85,6	51,715	323,31	1,51E-03	1,45E-03	1,70E-03	1,57E-03	1,46E-03	1,25E-03	1,33E-03	1,07E-03	1,25E-03	1,37E-03	
-3,3580922	0,097524	-2,1181098	0,230349	2,361957	+	0,004653	A4HBN3	Uncharacterized protein	13,1	25,225	6,839	2,77E-06	3,36E-06	1,60E-0								

-4,596134	0,041345	-3,4557662	0,09114	2,204372	+	0,005905	A4HCH7	Uncharacterized protein	24,2	46,968	37,669	1,89E-06	2,27E-06	1,26E-06	3,02E-06	1,69E-06	2,73E-06	5,39E-06	3,18E-06	5,61E-06	5,50E-06
-2,537991	0,172182	-5,233269	0,026585	0,154398	+	0,002714	A4HC15	Uncharacterized protein	13,9	49,634	11,019	7,16E-06	6,91E-06	1,19E-05	9,18E-06	8,48E-06	2,96E-06	1,52E-06	1,37E-06	2,45E-06	2,65E-07
3,7062182	13,05217	3,9701462	15,67231	1,200744	+	0,002727	A4HCJ3	Putative alanyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.7)	73,3	105,91	87,331	1,30E-03	1,39E-03	1,37E-03	1,39E-03	1,45E-03	1,75E-03	1,51E-03	1,80E-03	1,75E-03	1,51E-03
-0,6510484	0,636817	-0,0921062	0,938152	1,473189	+	0,004665	A4HCJ7	Exosome complex exonuclease RRP45-like protein	47,9	40,209	87,259	2,52E-05	2,59E-05	2,64E-05	2,65E-05	2,41E-05	2,88E-05	4,40E-05	3,27E-05	3,72E-05	4,96E-05
4,2598112	19,15715	3,7597664	13,54573	0,707085	+	0,000261	A4HCM1	Uncharacterized protein	77,3	42,212	323,31	7,61E-04	7,89E-04	8,93E-04	7,57E-04	8,52E-04	5,09E-04	6,24E-04	6,21E-04	6,00E-04	5,16E-04
4,4462642	21,80012	4,76554	27,03094	1,239945	+	0,006876	A4HCM4	GDPMP protein (EC 2.7.7.13)	82,8	41,335	323,31	8,91E-04	9,69E-04	8,57E-04	9,08E-04	8,79E-04	1,33E-03	9,64E-04	1,19E-03	1,03E-03	1,12E-03
5,2025016	36,82214	5,9680272	62,59724	1,699989	+	3,02E-05	A4HCQ1	Putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	90,6	38,305	323,31	1,35E-03	1,43E-03	1,68E-03	1,25E-03	1,38E-03	2,50E-03	2,17E-03	2,68E-03	2,47E-03	2,20E-03
3,7064026	13,05384	2,922775	7,583033	0,580904	+	0,005162	A4HCQ2	Putative cytochrome c oxidase subunit 10 (EC 1.9.3.1)	42,9	14,334	98,844	1,69E-04	1,24E-04	2,33E-04	2,52E-04	1,84E-04	1,20E-04	1,17E-04	1,12E-04	1,16E-04	8,32E-05
-2,4623606	0,181449	-4,4712976	0,045082	0,248456	+	0,004206	A4HCR6	Uncharacterized protein	22,4	19,686	24,674	4,89E-06	3,24E-06	3,02E-06	3,02E-06	4,02E-06	8,92E-07	7,67E-07	0,00E+00	2,89E-06	0,00E+00
2,9494586	7,724591	3,392705	10,50282	1,35966	+	0,000198	A4HCR9	Acetyl-coenzyme A synthetase (EC 6.2.1.1)	69,2	78,382	323,31	6,65E-04	5,97E-04	5,95E-04	5,40E-04	6,38E-04	7,80E-04	8,99E-04	7,58E-04	8,26E-04	8,61E-04
-4,9045462	0,033388	-3,0145738	0,123744	3,706281	+	1,05E-05	A4HCU0	Uncharacterized protein	21,9	88,424	39,697	2,15E-06	4,22E-06	2,90E-06	2,57E-06	3,31E-06	1,31E-05	1,18E-05	9,14E-06	9,33E-06	1,18E-05
4,183658	18,17216	4,6272786	24,71438	1,360013	+	0,004418	A4HCU5	Putative 3-ketoacyl-CoA thiolase (EC 2.3.1.16)	92,1	47,889	323,31	7,73E-04	9,25E-04	1,02E-03	7,78E-04	8,37E-04	1,44E-03	1,05E-03	1,19E-03	1,17E-03	1,06E-03
3,4893228	11,23029	3,1071356	8,616701	0,767273	+	0,000502	A4HD14	Uncharacterized protein	65,6	27,402	155,18	3,38E-04	3,10E-04	3,25E-04	2,75E-04	2,95E-04	2,52E-04	2,37E-04	2,15E-04	2,51E-04	2,29E-04
0,64912998	1,568222	1,0751793	2,106984	1,343549	+	0,001434	A4HD18	Uncharacterized protein	51,6	188,6	323,31	3,06E-04	3,35E-04	2,62E-04	3,28E-04	2,56E-04	3,87E-04	3,65E-04	3,95E-04	4,26E-04	4,14E-04
0,0747365	1,053169	0,8223426	1,768275	1,679005	+	0,002684	A4HD30	Uncharacterized protein	47,9	58,107	280,13	6,25E-05	4,04E-05	6,63E-05	8,12E-05	6,25E-05	8,93E-05	1,10E-04	9,93E-05	1,05E-04	1,13E-04
4,2510512	19,04118	3,3555054	10,23547	0,537544	+	7,67E-05	A4HD57	Cytochrome c oxidase subunit V (EC 1.9.3.1)	80,6	22,271	260,3	4,94E-04	3,25E-04	4,40E-04	4,00E-04	4,88E-04	2,02E-04	2,30E-04	2,45E-04	2,24E-04	2,40E-04
-1,4679256	0,361502	-0,6107273	0,654866	1,811517	+	0,000796	A4HD66	Uncharacterized protein	40,2	52,003	301,79	1,82E-05	1,52E-05	2,08E-05	2,41E-05	1,70E-05	2,52E-05	3,38E-05	3,94E-05	3,88E-05	3,52E-05
3,3545978	10,22903	2,7220346	6,598027	0,645029	+	0,000893	A4HD72	Glycosomal membrane like protein	55	23,565	323,31	2,21E-04	2,42E-04	2,71E-04	2,51E-04	2,22E-04	1,54E-04	2,09E-04	1,39E-04	1,42E-04	1,34E-04
2,7136992	6,560015	2,9484436	7,719159	1,176698	+	0,001471	A4HDC2	Kinesin-like protein	67,8	63,337	323,31	4,42E-04	4,03E-04	3,86E-04	4,16E-04	4,34E-04	4,67E-04	4,67E-04	5,16E-04	5,20E-04	4,78E-04
2,4398154	5,425723	2,7395596	6,678664	1,230926	+	0,006105	A4HDD5	Putative malic enzyme (EC 1.1.1.38)	78,2	63,444	323,31	3,75E-04	3,25E-04	3,07E-04	3,41E-04	3,79E-04	4,36E-04	3,69E-04	4,50E-04	4,56E-04	4,13E-04
-1,0570398	0,480617	-2,5600406	0,169571	0,352819	+	0,002435	A4HDD5	Uncharacterized protein	34,6	28,214	139,93	1,14E-05	1,25E-05	1,27E-05	1,75E-05	1,46E-05	7,27E-06	8,67E-06	3,86E-06	4,18E-06	2,46E-06
1,1329358	2,193046	0,7668161	1,701511	0,775866	+	0,002879	A4HDD9	Uncharacterized protein	49,8	57,221	323,31	1,26E-04	1,19E-04	1,42E-04	1,24E-04	1,19E-04	1,11E-04	9,96E-05	8,89E-05	1,04E-04	8,50E-05
1,6734886	3,18985	2,183442	4,54236	1,424004	+	0,001751	A4HD14;A4	Amastin-like surface protein-like protein	19	18,83	10,781	6,48E-05	5,54E-05	5,45E-05	6,05E-05	6,62E-05	7,24E-05	1,03E-04	9,61E-05	8,05E-05	7,93E-05
-5,9182786	0,016536	-2,4918276	0,177781	10,75139	+	1,37E-05	A4HDK1	Hypothetical predicted transmembrane protein	10,1	99,68	99,387	1,57E-06	9,57E-07	1,28E-06	3,59E-06	1,77E-06	1,20E-05	2,29E-05	1,68E-05	1,63E-05	2,35E-05
-0,3748282	0,771197	0,0323424	1,022671	1,326083	+	0,002296	A4HDK4;A4	Uncharacterized protein	32,7	43,95	99,239	3,30E-05	3,18E-05	3,33E-05	3,56E-05	3,40E-05	4,91E-05	5,40E-05	4,19E-05	4,95E-05	3,84E-05
1,11780864	2,170171	-1,1098798	0,463333	0,213501	+	5,36E-07	A4HDM4	Uncharacterized protein	50,8	64,689	323,31	1,59E-04	1,49E-04	1,28E-04	1,27E-04	1,42E-04	3,94E-05	2,38E-05	2,40E-05	3,14E-05	3,41E-05
-2,473738	0,180024	-1,9649384	0,25615	1,422866	+	0,005614	A4HDN3	Putative calcium/calmodulin-dependent protein kinase (EC 2.7.11.17)	24,1	155,32	124,86	2,77E-05	3,03E-05	2,03E-05	3,35E-05	3,01E-05	4,23E-05	3,63E-05	4,32E-05	3,69E-05	4,07E-05
-4,0344708	0,061024	-3,2686984	0,103759	1,70028	+	0,005509	A4HDQ0	Cyclin 10	24,3	75,145	83,579	4,33E-06	4,68E-06	6,20E-06	5,10E-06	3,17E-06	6,42E-06	7,72E-06	7,18E-06	7,46E-06	1,08E-05
-1,1300048	0,456914	-1,8068418	0,285816	0,625535	+	8,29E-05	A4HDQ5	Uncharacterized protein	47	73,427	308,97	3,42E-05	3,05E-05	3,48E-05	3,87E-05	3,04E-05	1,86E-05	2,38E-05	1,92E-05	2,20E-05	2,17E-05
4,5440416	23,32882	4,7019842	26,02785	1,115695	+	0,005842	A4HDR8	Transketolase (EC 2.2.1.1)	64,5	71,594	323,31	1,74E-03	1,62E-03	1,67E-03	1,61E-03	1,72E-03	1,95E-03	1,81E-03	1,94E-03	1,92E-03	1,71E-03
0,78005652	1,717198	-0,2802943	0,823423	0,479515	+	0,003539	A4HDS4	Putative ubiquitin-conjugating enzyme e2	21,3	17,107	101,91	2,30E-05	2,48E-05	3,66E-05	4,59E-05	2,28E-05	9,57E-06	1,87E-05	1,36E-05	1,64E-05	1,40E-05
-1,0591035	0,47993	0,6346166	1,552525	3,234898	+	0,001622	A4HDT4	Hypothetical predicted multi-pass transmembrane protein	27,2	20,024	23,129	1,61E-05	3,71E-06	1,08E-05	1,20E-05	1,06E-05	2,97E-05	3,36E-05	3,02E-05	2,86E-05	3,36E-05
0,4828262	1,397479	2,195424	4,580243	3,277505	+	4,55E-07	A4HDT6	Putative fatty-acid desaturase (EC 1.14.19.1)	40,9	48,952	323,31	6,94E-05	8,21E-05	6,17E-05	6,98E-05	6,07E-05	2,78E-04	1,96E-04	2,23E-04	2,24E-04	2,08E-04
0,03322453	1,023297	0,5122525	1,426275	1,393804	+	0,00451	A4HDW6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (EC 3.4.19.12)	51,1	25,146	319,51	2,56E-05	2,48E-05	2,26E-05	3,24E-05	2,41E-05	4,14E-05	4,00E-05	3,51E-05	2,96E-05	3,48E-05
-2,7417724	0,149501	-1,3319374	0,397234	2,657068	+	0,000868	A4HDX0	Uncharacterized protein	20,8	36,076	78,831	6,71E-06	9,11E-06	5,07E-06	3,76E-06	3,94E-06	1,14E-05	1,34E-05	1,27E-05	1,78E-05	1,76E-05
0,5650533	1,479442	1,6383076	3,113004	2,104174	+	1,16E-06	A4HDY2	Uncharacterized protein	64	11,077	16,105	1,57E-05	1,82E-05	1,77E-05	1,51E-05	1,55E-05	3,27E-05	3,71E-05	3,10E-05	3,88E-05	3,33E-05
-3,6215126	0,081249	-2,771689	0,146433	1,802281	+	0,00031	A4HE16	Uncharacterized protein	15,6	109,61	39,344	8,66E-06	7,37E-06	7,71E-06	9,81E-06	1,17E-05	1,37E-05	1,59E-05	1,86E-05	1,53E-05	1,72E-05
-2,6431102	0,160083	-1,698645	0,308075	1,924475	+	0,002161	A4HE19	Uncharacterized protein	30,2	46,924	172	6,51E-06	7,50E-06	1,05E-06	6,60E-06	7,01E-06	1,01E-05	1,79E-05	1,34E-05	1,96E-05	1,33E-05
2,5454054	5,837722	2,3146198	4,974735	0,852171	+	0,000685	A4HE33	Putative dynein heavy chain	62,7	537,95	323,31	3,11E-03	3,34E-03	3,13E-03	3,16E-03	2,96E-03	2,81E-03	2,54E-03	2,83E-03	2,66E-03	2,55E-03
1,9097388	3,757411	2,4206716	5,354202	1,424971	+	0,00176	A4HE42	Uncharacterized protein	53,2	81,949	323,31	3,36E-04	3,12E-04	2,45E-04	3,47E-04	3,12E-04	3,95E-04	4,67E-04	3,87E-04	4,68E-04	4,86E-04
1,0951152	2,136301	1,4637626	2,758268	1,291142	+	0,002151	A4HE43	Uncharacterized protein	60,8	98,666	323,31	2,13E-04	2,04E-04	2,06E-04	2,35E-04	1,99E-04	2,40E-04	3,20E-04	2,52E-04	2,83E-04	2,73E-04
4,0525082	16,59306	5,2008682	36,78047	2,216618	+	7,83E-07	A4HE56	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.2.1.3)	76,2	53,854	323,31	9,27E-04	9,00E-04	9,11E-04	8,81E-04	8,49E-04	1,98E-03	2,41E-03	2,03E-03	1,80E-03	1,75E-03
3,8143884	14,06842	2,856894	7,24454	0,51495	+	6,36E-06	A4HE57	Putative cytochrome c oxidase VII (EC 1.9.3.1)	70,3	19,2	323,31	2,44E-04	3,01E-04	2,90E-04	2,74E-04	2,46E-04	1,17E-04	1,36E-04	1,49E-04	1,47E-04	1,50E-04
3,907557	15,00693	3,4851276	11,19768	0,746167	+	0,002731	A4HE62	Ribosomal protein S25	70,8	13,108	38,09	2,10E-04	1,97E-04	1,93E-04	1,76E-04	2,11E-04	1,67E-04	1,62E-04	1,42E-04	1,19E-04	1,49E-04
1,7040266	3,25809	1,3897892	2,620044	0,804276	+	0,000359	A4HE78	Uncharacterized protein	67,8	88,473	323,31	2,77E-04	2,97E-04	2,82E-04	2,84E-04	3,03E-04	2,45E-04	2,28E-04	2,54E-04	2,25E-04	2,11E-04
-0,1038436	0,930551	-0,4																			

3,2151424	9,286548	3,5894886	12,03771	1,296252	+	1,05E-06	A4HF16	Proline oxidase, mitochondrial-like protein (EC 1.5.3.-)	71	63,685	323,31	5,71E-04	5,74E-04	6,19E-04	5,82E-04	6,14E-04	7,74E-04	7,77E-04	7,74E-04	7,76E-04	
1,15402766	2,225343	-0,055111	0,962494	0,432515	+	2,75E-06	A4HF36	Deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) (EC 1.14.99.29)	66,7	36,242	170,55	7,49E-05	8,75E-05	6,77E-05	9,07E-05	8,50E-05	3,32E-05	3,84E-05	3,15E-05	3,98E-05	3,22E-05
1,4340312	2,702007	1,9129258	3,76572	1,393675	+	3,18E-05	A4HF39	Putative mitotubule-associated protein Gb4	62,5	286,24	323,31	8,10E-04	7,65E-04	8,32E-04	7,50E-04	7,15E-04	1,11E-03	9,87E-04	1,11E-03	1,16E-03	1,03E-03
0,8455368	1,796933	-0,1361703	0,909931	0,50638	+	8,15E-05	A4HF44	Uncharacterized protein	68,8	39,735	323,31	7,39E-05	7,32E-05	6,98E-05	7,64E-05	6,42E-05	2,67E-05	4,33E-05	4,28E-05	3,52E-05	3,54E-05
-1,4124128	0,375683	-0,6453286	0,639347	1,701827	+	0,000372	A4HF48	Uncharacterized protein	16,8	38,065	31,487	1,75E-05	1,23E-05	1,58E-05	1,53E-05	1,15E-05	2,86E-05	2,21E-05	2,39E-05	2,39E-05	2,35E-05
-3,234608	0,106239	-2,35709	0,195184	1,837212	+	0,005128	A4HF50	Uncharacterized protein	20,8	118,41	76,813	1,10E-05	1,68E-05	1,32E-05	1,33E-05	9,67E-06	2,01E-05	2,58E-05	1,54E-05	3,32E-05	2,49E-05
-0,8729077	0,546045	-0,2425338	0,845259	1,547966	+	0,001009	A4HF74	Uncharacterized protein	34,1	135,82	151,55	6,60E-05	7,11E-05	8,27E-05	7,67E-05	7,53E-05	1,08E-04	1,56E-04	1,04E-04	1,10E-04	1,03E-04
0,52066646	1,434618	-0,3755255	0,770825	0,537303	+	0,000714	A4HF85	Putative peroxisomal membrane protein 4	38,9	24,945	48,182	4,06E-05	2,94E-05	2,96E-05	3,73E-05	4,41E-05	2,00E-05	2,59E-05	1,85E-05	1,63E-05	1,69E-05
-0,0857199	0,942314	-0,9397677	0,521317	0,55323	+	0,000493	A4HF80	Uncharacterized protein	58,6	94,082	323,31	1,05E-04	8,86E-05	9,31E-05	7,40E-05	8,58E-05	5,76E-05	5,61E-05	4,01E-05	5,65E-05	3,89E-05
-6,814282	0,008886	-4,0766204	0,059267	6,669884	+	0,007309	A4HF81	ABC transporter-like protein	5	139,9	5,6751	1,66E-06	6,44E-07	1,07E-06	1,40E-06	1,85E-06	1,71E-06	1,80E-05	1,70E-05	3,83E-06	1,94E-05
-1,0443853	0,484851	-2,3126968	0,201284	0,415145	+	0,002436	A4HFD6	Uncharacterized protein	54,2	20,853	17,185	1,20E-05	1,26E-05	8,31E-06	9,87E-06	8,46E-06	7,47E-06	2,42E-06	3,83E-06	4,79E-06	3,92E-06
-2,8331128	0,140329	-1,183937	0,440149	3,136544	+	0,001968	A4HFE0	Uncharacterized protein	22,3	34,299	15,777	5,97E-06	7,07E-06	2,42E-06	3,83E-06	6,59E-06	1,02E-05	1,58E-05	1,41E-05	1,34E-05	2,59E-05
0,99972166	1,999614	0,305723	1,236038	0,618138	+	0,00076	A4HFE4	Flap endonuclease 1 (FEN-1) (EC 3.1.1.-) (Flap structure-specific endonuclease 1)	52,9	44,143	129,46	9,07E-05	8,50E-05	8,64E-05	8,15E-05	9,91E-05	5,99E-05	6,89E-05	5,82E-05	4,52E-05	4,45E-05
-0,6992904	0,615875	0,1295137	1,093925	1,776212	+	0,000399	A4HFF3	Uncharacterized protein	37	55,26	165,49	3,21E-05	3,20E-05	3,23E-05	4,16E-05	3,31E-05	5,45E-05	5,07E-05	8,26E-05	5,64E-05	6,29E-05
2,467114	5,529366	2,1305548	4,378858	0,791928	+	0,004559	A4HFG6	Putative ribokinase (EC 2.7.1.15)	74,5	35,361	323,31	2,06E-04	2,06E-04	1,72E-04	1,80E-04	2,18E-04	1,59E-04	1,47E-04	1,68E-04	1,37E-04	1,76E-04
-0,3569534	0,780812	-1,4345943	0,369951	0,473803	+	0,00372	A4HFG9	Ribosome biogenesis protein	51,2	39,366	53,302	3,81E-05	2,73E-05	2,16E-05	2,85E-05	4,28E-05	1,79E-05	1,11E-05	1,57E-05	1,01E-05	2,08E-05
-1,471538	0,360598	-1,0285101	0,490216	1,359455	+	0,003932	A4HFG1	Uncharacterized protein (Fragment)	31,6	344,65	323,31	1,15E-04	1,31E-04	9,84E-05	1,49E-04	1,33E-04	1,63E-04	1,73E-04	1,54E-04	1,82E-04	1,74E-04
1,908893	3,755208	2,299496	4,922858	1,310941	+	0,001066	A4HFL1	Putative 2-oxoglutarate dehydrogenase subunit	62	113,53	323,31	4,01E-04	4,69E-04	4,84E-04	3,81E-04	4,04E-04	5,38E-04	5,82E-04	5,13E-04	5,71E-04	5,95E-04
-2,3362492	0,198024	-3,0127186	0,123903	0,625695	+	0,003031	A4HFR1	Uncharacterized protein	23,2	44,26	24,364	8,74E-06	9,68E-06	9,30E-06	8,43E-06	7,80E-06	6,02E-06	3,73E-06	6,39E-06	6,68E-06	5,17E-06
2,4265046	5,375894	-2,9174876	7,555292	1,405402	+	0,004472	A4HFS1	Uncharacterized protein	77,2	25,259	323,31	1,27E-04	1,81E-04	1,20E-04	1,30E-04	1,28E-04	2,07E-04	1,98E-04	2,12E-04	1,74E-04	1,68E-04
-2,0971559	0,233719	-4,106561	0,05805	0,248376	+	0,001397	A4HFT4	Uncharacterized protein	27,2	48,688	14,896	2,60E-05	1,21E-05	9,16E-06	6,32E-06	1,05E-05	4,45E-06	4,00E-06	2,19E-06	2,62E-06	1,76E-06
2,4865094	5,604204	2,0939796	4,269241	0,761793	+	0,003608	A4HFU3	Uncharacterized protein	69,9	59,497	323,31	3,44E-04	3,91E-04	2,90E-04	2,96E-04	3,56E-04	2,22E-04	2,57E-04	2,72E-04	2,68E-04	2,54E-04
-1,8658776	0,274356	-3,42725	0,09296	3,388829	+	0,003033	A4HFV0	Casein kinase I-like protein	26,8	61,348	29,671	2,08E-05	1,97E-05	1,47E-05	1,42E-05	1,56E-05	7,91E-06	1,06E-05	4,31E-06	2,59E-06	6,45E-06
2,8467616	7,193838	3,3200424	9,986938	1,388263	+	0,000367	A4HFW1	Putative trypanothione synthetase (EC 6.1.1.59)	65,6	74,296	323,31	5,85E-04	4,83E-04	5,54E-04	5,55E-04	5,01E-04	8,36E-04	6,73E-04	7,14E-04	8,02E-04	6,96E-04
3,153889	8,900516	2,6750986	6,386824	0,717579	+	0,000727	A4HFX9	D-lactate dehydrogenase-like protein	79,3	53,872	323,31	4,96E-04	4,81E-04	4,85E-04	4,82E-04	4,55E-04	3,45E-04	2,72E-04	3,68E-04	3,75E-04	3,73E-04
0,04752778	1,033492	-0,6545308	0,635282	0,614694	+	0,003271	A4HFZ8	Putative dual specificity protein phosphatase	55,2	39,348	131,69	3,02E-05	5,35E-05	3,66E-05	4,63E-05	4,05E-05	3,02E-05	2,54E-05	2,04E-05	2,65E-05	2,35E-05
-4,403418	0,047254	-3,3424294	0,098589	2,086361	+	0,002765	A4HG04	Uncharacterized protein	17	70,846	191,18	5,49E-06	2,16E-06	3,20E-06	2,77E-06	3,99E-06	7,78E-06	5,54E-06	7,26E-06	8,05E-06	6,59E-06
1,91381	3,768029	-1,1999827	2,297369	0,609701	+	0,000956	A4HG16	Uncharacterized protein	70,4	41,096	323,31	1,59E-04	1,44E-04	1,58E-04	1,42E-04	1,73E-04	8,25E-05	9,22E-05	1,04E-04	7,53E-05	1,26E-04
0,32103142	1,249223	0,9092535	1,878073	1,503393	+	0,000156	A4HG26	Uncharacterized protein	47,5	32,655	71,725	4,52E-05	3,73E-05	4,00E-05	4,29E-05	3,95E-05	5,88E-05	5,41E-05	5,67E-05	6,98E-05	6,84E-05
1,07178964	2,102039	1,5546568	2,937638	1,397518	+	0,000296	A4HG27	Uncharacterized protein	67,2	61,268	323,31	1,31E-04	1,35E-04	1,21E-04	1,19E-04	1,40E-04	1,60E-04	1,70E-04	1,75E-04	1,93E-04	2,06E-04
0,42392602	1,341573	-0,3919738	0,762086	0,568054	+	0,003681	A4HGS2	Uncharacterized protein	51,9	9,1294	42,696	1,12E-05	1,51E-05	1,46E-05	1,19E-05	9,36E-06	6,69E-06	1,04E-05	5,99E-06	5,56E-06	7,03E-06
0,69499788	1,618882	1,5894158	3,009275	1,85886	+	0,000575	A4HGS9	Uncharacterized protein	16,5	23,319	12,537	3,58E-05	3,32E-05	2,77E-05	5,22E-05	4,49E-05	5,17E-05	9,45E-05	8,87E-05	5,44E-05	7,23E-05
-2,0748526	0,23736	-3,265283	0,104004	0,438172	+	0,000575	A4HG71	Uncharacterized protein	26,6	74,05	59,55	1,59E-05	1,90E-05	1,97E-05	1,85E-05	1,53E-05	8,97E-06	8,32E-06	8,92E-06	8,99E-06	
-1,9693288	0,255372	-1,3988212	0,379239	1,485046	+	0,006563	A4HG75	Uncharacterized protein	23,8	125,09	309,96	3,45E-05	2,78E-05	3,10E-05	4,43E-05	2,52E-05	4,09E-05	4,61E-05	4,65E-05	5,02E-05	5,47E-05
2,2541542	4,770545	2,8754326	7,338232	1,538238	+	0,000217	A4HG79	Uncharacterized protein	59,7	41,99	323,31	1,96E-04	2,18E-04	2,24E-04	2,11E-04	1,60E-04	3,02E-04	3,42E-04	3,12E-04	3,05E-04	2,83E-04
0,67157454	1,59281	0,9269012	1,901188	1,193606	+	0,002484	A4HG84	Putative ribonuclease II-like protein	52,5	103,59	323,31	1,69E-04	1,67E-04	1,60E-04	1,74E-04	1,57E-04	2,13E-04	2,08E-04	1,73E-04	1,99E-04	1,94E-04
-0,8054173	0,572197	-0,2403316	0,846551	1,479475	+	0,000524	A4HG87	Carbonic anhydrase-like protein	35,3	66,656	323,31	4,60E-05	3,45E-05	3,40E-05	4,27E-05	3,51E-05	5,58E-05	5,88E-05	5,02E-05	5,83E-05	5,97E-05
-1,6402332	0,320805	-0,9267541	0,526041	1,639754	+	0,003794	A4HG89	Putative propionyl-coa carboxylase beta chain (EC 6.4.1.3)	42,3	56,768	309,69	2,50E-05	1,93E-05	1,58E-05	1,80E-05	1,45E-05	2,64E-05	3,14E-05	2,39E-05	3,79E-05	3,16E-05
-0,3900737	0,763091	-2,6119114	0,163582	0,214368	+	9,59E-06	A4HG99	Uncharacterized protein	53,9	55,757	293,31	4,23E-05	3,58E-05	3,94E-05	5,28E-05	4,42E-05	1,31E-05	1,09E-05	9,54E-06	8,27E-06	5,66E-06
-3,4180052	0,093557	-2,597023	0,165279	1,766608	+	0,000194	A4HG81	Uncharacterized protein	14,9	25,809	44,969	2,16E-06	2,55E-06	2,04E-06	2,35E-06	3,12E-06	3,85E-06	4,93E-06	4,18E-06	4,55E-06	3,92E-06
-0,1514493	0,900346	-1,1447892	0,452256	0,502314	+	4,23E-05	A4HGC7	Uncharacterized protein	24,6	59,672	47,422	4,81E-05	5,22E-05	6,44E-05	5,16E-05	5,37E-05	2,93E-05	3,15E-05	2,12E-05	2,90E-05	2,53E-05
2,5295864	5,774061	2,9543877	7,751024	1,342387	+	0,002414	A4HG03	Ribonucleoside-diphosphate reductase (EC 1.17.4.1)	59,1	90,791	323,31	5,01E-04	5,32E-04	5,02E-04	5,84E-04	5,06E-04	7,32E-04	6,18E-04	6,23E-04	7,08E-04	8,62E-04
0,8435368	1,794444	-1,0647974	0,47804	0,2664	+	8,06E-06	A4HGE2	Uncharacterized protein	59,2	27,501	156,36	6,17E-05	4,60E-05	5,29E-05	4,32E-05	4,53E-05	1,65E-05	1,72E-05	1,18E-05	1,26E-05	9,24E-06
-4,205262	0,054211	-5,1355532	0,028448	0,524752	+	0,004131	A4HGE4	Uncharacterized protein	14,4	116,33	30,914	5,19E-06	7,81E-06	4,80E-06	6,47E-06	7,94E-06	4,65E-06	2,31E-06	2,68E-06	3,71E-06	3,17E-06
2,1178888	4,340583	1,3322166	2,517892	0,580082	+	1,7E-05	A4HGF0	Uncharacterized protein	63,1	43,952	323,31	1,81E-04	1,83E-04	2,18E-04	1,94E-04	1,80E-04	1,03E-04	1,34E-04	1,04E-04	1,08E-04	1,08E-04
-2,1584772	0,223993	-5,9671524	0,015985	0,071363	+	0,001069	A4HG17	Uncharacterized protein	43,2	26,944	64,596</										

-2,1603658	0,2237	-1,0540022	0,366016	1,636194	+	9,13E-05	A4HHG1	Uncharacterized protein	23,3	132,09	237,26	2,81E-05	3,41E-05	2,60E-05	3,05E-05	2,95E-05	4,88E-05	5,76E-05	4,21E-05	4,56E-05	4,88E-05
-0,2270138	0,854402	-1,0664684	0,477486	0,558855	+	0,00204	A4HHG2	Uncharacterized protein	21,2	74,214	323,31	7,99E-05	5,10E-05	5,23E-05	7,13E-05	6,74E-05	4,91E-05	3,65E-05	2,78E-05	3,56E-05	3,16E-05
-2,0259144	0,245549	-4,5431538	0,042892	0,174677	+	0,00022	A4HHG4	Uncharacterized protein	7,5	72,243	8,3603	1,51E-05	1,55E-05	1,80E-05	2,23E-05	1,86E-05	4,42E-06	3,76E-06	4,39E-06	1,08E-06	3,62E-06
-0,2381098	0,847855	1,2501642	2,378685	2,805531	+	5,37E-06	A4HHG9	Putative glutamyl carboxypeptidase (EC 3.4.-.-)	57,4	44,112	289,15	4,37E-05	3,58E-05	3,03E-05	3,36E-05	4,60E-05	1,22E-04	8,82E-05	9,71E-05	1,14E-04	1,08E-04
-1,2454335	0,421781	0,1479752	1,108013	2,626986	+	2,19E-05	A4HHH8	Putative ABC transporter domain protein	45,5	47,587	165,64	2,49E-05	2,13E-05	1,46E-05	2,33E-05	1,80E-05	4,57E-05	6,29E-05	5,15E-05	5,48E-05	5,03E-05
5,8495338	57,66139	5,3362332	40,39859	0,700618	+	0,000273	A4HHI4	Histone H2A	71	13,878	195,96	7,56E-04	7,39E-04	7,92E-04	8,59E-04	8,63E-04	5,54E-04	6,02E-04	4,69E-04	5,77E-04	6,15E-04
-6,7686826	0,009171	-4,7515418	0,037123	0,407808	+	0,001416	A4HHK4	Uncharacterized protein	11,5	77,94	34,238	0,00E+00	3,09E-07	9,28E-07	6,55E-07	1,68E-06	0,00E+00	3,45E-06	2,39E-06	3,16E-06	3,49E-06
2,169002	4,497122	2,6417414	6,240845	1,387742	+	2,29E-05	A4HHM4	Putative aminopeptidase (EC 3.4.-.-)	68,9	96,753	323,31	4,36E-04	4,78E-04	3,92E-04	4,38E-04	4,37E-04	5,73E-04	6,35E-04	5,98E-04	5,85E-04	6,31E-04
0,80780416	1,750545	1,3633234	2,572772	1,469697	+	0,00559	A4HHM9	Putative ubiquitin hydrolase (EC 3.1.1.2.15)	44,5	81,845	323,31	1,47E-04	1,39E-04	1,81E-04	1,59E-04	1,04E-04	2,22E-04	2,36E-04	1,85E-04	2,14E-04	2,00E-04
0,95144192	1,933804	0,2998705	1,231034	0,636587	+	0,002946	A4HHP3	Uncharacterized protein	57,8	82,324	323,31	1,33E-04	1,98E-04	1,60E-04	1,59E-04	1,52E-04	1,36E-04	9,82E-05	1,09E-04	8,90E-05	8,34E-05
1,899873	3,731803	1,6137458	3,060454	0,820101	+	0,003895	A4HHR1	Uncharacterized protein	62,4	133,97	323,31	5,15E-04	4,97E-04	4,54E-04	5,79E-04	4,64E-04	3,83E-04	4,18E-04	4,41E-04	4,11E-04	3,98E-04
-0,599351	0,660051	-1,2763288	0,412845	0,625474	+	0,005604	A4HHR2	Uncharacterized protein	41	48,163	95,345	3,87E-05	3,63E-05	2,26E-05	3,56E-05	2,87E-05	2,26E-05	2,06E-05	1,48E-05	2,04E-05	2,21E-05
-4,6145192	0,040822	-6,0988912	0,01459	0,357404	+	0,005534	A4HHR4	Putative helicase	11,6	105,48	11,396	3,33E-06	4,00E-06	3,04E-06	7,26E-06	5,03E-06	7,48E-07	1,53E-06	1,62E-06	3,08E-06	1,51E-06
0,16955194	1,124709	-0,653487	0,635742	0,56525	+	0,002603	A4HHR6	Uncharacterized protein	58,9	40,743	308,68	5,66E-05	4,91E-05	3,42E-05	4,62E-05	4,61E-05	3,42E-05	2,99E-05	2,55E-05	2,42E-05	1,85E-05
-1,7232672	0,302862	-0,0770216	0,948013	3,13018	+	6,09E-05	A4HHS0	Uncharacterized protein	47,4	84,084	205,4	2,78E-05	1,52E-05	2,50E-05	3,24E-05	3,12E-05	7,87E-05	7,88E-05	6,84E-05	7,64E-05	9,90E-05
-0,6361714	0,643418	-3,934873	0,065386	0,101623	+	0,000359	A4HHU8	Uncharacterized protein	59,4	28,749	74,418	1,85E-05	2,63E-05	1,21E-05	1,68E-05	2,19E-05	3,08E-06	2,09E-06	4,50E-07	3,00E-06	2,72E-06
0,85472714	1,808417	0,3309323	1,257826	0,69554	+	0,001814	A4HHV0	Uncharacterized protein	46,6	86,707	323,31	1,44E-04	1,57E-04	1,59E-04	1,79E-04	1,46E-04	1,21E-04	1,05E-04	1,34E-04	9,90E-05	9,14E-05
-2,5926844	0,165777	-3,086067	0,117761	0,710358	+	0,006524	A4HHW1	Uncharacterized protein	17,7	68,887	49,159	1,25E-05	9,89E-06	1,11E-05	1,08E-05	1,30E-05	1,01E-05	8,01E-06	5,76E-06	7,15E-06	9,20E-06
0,44402657	1,360396	-0,4323715	0,714043	0,544726	+	0,005535	A4HHW5	rRNA adenine N(6)-methyltransferase (EC 2.1.1.-)	64,8	40,361	189,29	5,23E-05	6,06E-05	6,57E-05	5,52E-05	4,33E-05	2,50E-05	2,38E-05	3,75E-05	2,27E-05	4,71E-05
-0,0663052	0,955081	0,2695698	1,205448	1,262143	+	0,002509	A4HHY0	Uncharacterized protein	66	91,316	323,31	8,04E-05	8,16E-05	9,35E-05	8,88E-05	9,35E-05	9,88E-05	1,15E-04	1,12E-04	1,25E-04	1,25E-04
3,5687036	11,86552	4,3127242	19,87281	1,674837	+	0,000995	A4HHY2	Kinesin-like protein	75	67,148	323,31	8,68E-04	7,82E-04	7,42E-04	7,95E-04	8,07E-04	1,53E-03	9,21E-04	1,62E-03	1,35E-03	1,37E-03
-1,3995184	0,379056	-2,7332092	0,150391	0,396752	+	0,003271	A4HI01	Uncharacterized protein	46,1	51,76	126,72	1,44E-05	2,79E-05	2,23E-05	1,35E-05	2,42E-05	1,17E-05	9,84E-06	4,90E-06	5,55E-06	9,16E-06
2,0112862	4,031415	1,0272986	2,038204	0,50558	+	0,001283	A4HI13	Putative ribosome biogenesis regulatory protein (RRS1)	62,5	25,054	323,31	1,22E-04	1,10E-04	1,11E-04	7,50E-05	9,36E-05	7,10E-05	3,89E-05	5,63E-05	5,52E-05	4,07E-05
3,8317286	14,23853	2,0320728	4,08992	0,827243	+	0,000849	A4HI41	Putative surface protein amastin	26,3	21,235	37,271	2,56E-04	5,09E-04	1,90E-04	4,69E-04	2,17E-04	1,04E-04	1,25E-04	7,75E-05	5,81E-05	8,39E-05
-1,93802	0,260974	-1,2437386	0,422277	1,618078	+	0,00423	A4HI46	Putative ubiquitin-protein ligase (EC 6.3.2.19)	37,3	152,38	323,31	4,27E-05	3,31E-05	3,51E-05	4,80E-05	4,20E-05	4,44E-05	8,01E-05	6,53E-05	6,49E-05	7,32E-05
-2,8593532	0,1378	-4,5379144	0,043048	0,312394	+	0,000123	A4HI74	Uncharacterized protein	18,4	100,68	42,189	2,01E-05	1,35E-05	1,45E-05	1,04E-05	1,26E-05	5,57E-06	5,93E-06	3,17E-06	3,32E-06	4,41E-06
1,4669076	2,764287	1,0530472	2,074908	0,750612	+	0,000519	A4HI76	Putative calcium-binding protein	48,2	46,585	227,8	1,38E-04	1,33E-04	1,13E-04	1,38E-04	1,24E-04	1,02E-04	8,88E-05	9,54E-05	9,09E-05	1,07E-04
-0,7456421	0,596402	-0,5940548	0,331239	0,555395	+	0,001135	A4HI88	Uncharacterized protein	46,9	55,938	135,59	3,36E-05	3,12E-05	2,73E-05	3,36E-05	4,28E-05	2,06E-05	1,69E-05	1,34E-05	2,14E-05	2,20E-05
-6,1036116	0,014542	-2,0636722	0,239206	16,44913	+	6,34E-06	A4HI46	Putative ferric reductase	16,3	119,72	127,3	1,44E-06	0,00E+00	0,00E+00	1,20E-06	3,29E-06	2,31E-05	3,04E-05	2,56E-05	2,83E-05	3,77E-05
-3,8268696	0,070469	-0,5911022	0,663836	9,420263	+	0,001841	A4HIC0	Succinyl-coa-3-ketoacid-coenzyme a transferase-like protein	27,7	22,762	46,156	2,90E-06	3,25E-06	2,78E-07	2,43E-06	1,67E-06	2,62E-05	1,74E-05	1,25E-05	8,28E-06	1,21E-06
-4,673118	0,039197	-7,6141232	0,005104	0,130217	+	0,00124	A4HI21	Uncharacterized protein	8,3	132,68	13,693	2,68E-06	4,65E-06	1,45E-05	8,06E-06	2,60E-06	8,93E-07	7,97E-07	2,67E-07	6,21E-07	1,21E-06
-3,9063604	0,066691	-2,0215056	0,246301	3,693158	+	0,002104	A4HI1E	Putative alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1)	41,1	43,652	62,626	2,93E-06	3,36E-06	3,06E-06	1,84E-06	3,76E-06	3,73E-06	1,39E-05	1,29E-05	1,43E-05	1,51E-05
-1,473856	0,360019	-0,7374985	0,599778	1,665964	+	0,007222	A4HI2	Uncharacterized protein	41,2	90,019	323,31	3,42E-05	3,29E-05	3,99E-05	3,82E-05	2,08E-05	5,29E-05	5,91E-05	7,05E-05	4,60E-05	4,52E-05
-4,9134804	0,033181	-3,601056	0,082409	2,483585	+	0,005956	A4HIG1	ATP-dependent DEAD/H DNA helicase recQ family-like protein	22,1	108,04	53,338	3,13E-06	6,08E-06	2,10E-06	3,91E-06	3,77E-06	5,39E-06	7,72E-06	8,31E-06	1,04E-05	1,56E-05
-3,9728648	0,063687	-3,3092646	0,100882	1,584031	+	0,000916	A4HIG6	Conserved zinc-finger protein	16,6	127,13	53,305	9,70E-06	7,18E-06	8,33E-06	6,70E-06	8,94E-06	1,12E-05	1,21E-05	1,47E-05	1,18E-05	1,48E-05
-0,6831318	0,622812	-0,168192	0,889957	1,428935	+	0,005509	A4HIH5	Uncharacterized protein	36,3	85,214	218,57	4,93E-05	6,00E-05	5,17E-05	6,04E-05	4,56E-05	7,31E-05	9,20E-05	5,85E-05	5,90E-05	7,34E-05
-2,927403	0,131451	-2,1819606	0,220376	1,676488	+	0,002208	A4HII2	Putative Tyrosine/dopa decarboxylase (EC 4.1.1.25)	27,2	55,945	66,068	5,59E-06	7,33E-06	7,36E-06	8,94E-06	7,92E-06	9,64E-06	1,23E-05	1,13E-05	1,22E-05	1,63E-05
-2,60717	0,164121	-2,1851532	0,219889	1,339799	+	0,006214	A4HII5	AAA family ATPase-like protein	30,4	99,755	61,073	1,81E-05	1,84E-05	1,51E-05	1,57E-05	1,50E-05	1,83E-05	2,22E-05	2,05E-05	2,25E-05	2,72E-05
-1,629891	0,323113	-0,7276923	0,603869	1,868912	+	0,006058	A4HIL3	Uncharacterized protein	24,5	30,142	31,666	6,76E-06	1,05E-05	1,02E-05	1,18E-05	1,03E-05	1,51E-05	2,08E-05	1,16E-05	2,43E-05	2,26E-05
4,3953402	21,04405	5,073581	33,67442	1,600187	+	0,002789	A4HIL9	Uncharacterized protein	65,2	13,048	198,14	2,95E-04	1,89E-04	2,56E-04	3,34E-04	3,28E-04	3,84E-04	4,53E-04	4,69E-04	4,61E-04	4,36E-04
-4,8362404	0,035006	-3,7859596	0,072496	2,070933	+	0,003083	A4HIN9	Protein kinase-like protein	17,7	208,47	65,8	6,49E-06	9,54E-06	1,09E-05	7,10E-06	4,31E-06	1,38E-05	1,60E-05	1,85E-05	1,52E-05	1,27E-05
4,9824062	31,61213	4,5436058	23,31943	0,737674	+	0,000951	A4HIP3	Uncharacterized protein	81,1	36,367	323,31	1,22E-03	1,17E-03	1,23E-03	1,03E-03	1,11E-03	8,39E-04	1,02E-03	7,55E-04	8,25E-04	8,19E-04
2,4634588	5,515374	2,2101056	4,627252	0,838973	+	0,004119	A4HIQ1	Uncharacterized protein	82,7	48,919	323,31	2,71E-04	2,87E-04	2,55E-04	2,86E-04	2,51E-04	2,30E-04	2,32E-04	2,49E-04	2,22E-04	2,01E-04
-4,6739312	0,039175	-7,8153714	0,00444	0,113327	+	0,000737	A4HIQ4	TATE DNA transposons	19,6	238,39	70,547	1,40E-05	1,07E-05	7,28E-06	6,93E-06	9,36E-06	8,54E-07	4,76E-07	0,00E+00	1,66E-06	5,16E-07
-1,6607774	0,316269	-2,2103528	0,216081	0,683221	+	7,44E-06	A4HIT2	DNA ligase (EC 6.5.1.1)	31,1	85,939	304,16	2,62E-05	2,63E-05	2,77E-05	2,76E-05	2,81E-05	1,84E-05	1,88E-05	1,83E-05	1,68E-05	2,08E-05
1,5419124	2,911802	0,7157241	1,642307	0,564017	+	0,001147	A4HIT4	Uncharacterized protein	70,8	44,319	3										

1,5124804	2,853001	0,2026898	1,150842	0,403379	+	4,29E-05	A4HJ4	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase-like protein	46,9	50,903	323,31	1,70E-04	1,19E-04	1,25E-04	1,35E-04	1,89E-04	7,08E-05	6,72E-05	5,55E-05	5,24E-05	4,99E-05
-0,5850016	0,666649	0,0959223	1,068748	1,603166	+	0,000543	A4HJ9	Uncharacterized protein	22,5	40,329	46,61	3,35E-05	2,92E-05	2,20E-05	2,43E-05	2,67E-05	4,01E-05	4,07E-05	5,03E-05	4,47E-05	4,05E-05
-0,0948265	0,936385	0,9277849	1,902353	2,031593	+	1,71E-05	A4HJ5	Uncharacterized protein	48,5	101,55	323,31	9,93E-05	8,81E-05	8,90E-05	9,86E-05	1,01E-04	1,54E-04	2,31E-04	1,84E-04	1,86E-04	2,21E-04
-3,5307736	0,086523	-4,174164	0,055393	0,640207	+	0,004881	A4HJM7	Uncharacterized protein	21	26,755	100,33	2,49E-06	2,23E-06	2,53E-06	2,30E-06	2,07E-06	1,77E-06	1,50E-06	1,82E-06	9,83E-07	1,50E-06
0,92532184	1,899108	-2,359915	1,177716	0,620142	+	0,001696	A4HJM8	Uncharacterized protein	53,4	24,618	215,32	4,58E-05	5,89E-05	3,77E-05	3,94E-05	5,58E-05	2,91E-05	2,53E-05	2,89E-05	3,47E-05	2,79E-05
1,03423078	2,048021	0,6084565	1,524627	0,744439	+	0,002874	A4HP9	DNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.6)	61,5	184,49	323,31	3,28E-04	4,00E-04	3,44E-04	4,22E-04	4,05E-04	2,44E-04	2,68E-04	2,86E-04	2,88E-04	3,28E-04
-1,656307	0,31725	-0,7696417	0,586563	1,848898	+	4,13E-05	A4HJR4	Kinetoplast-associated protein-like protein	28,2	136,2	318,96	4,31E-05	3,92E-05	4,14E-05	4,94E-05	4,35E-05	6,91E-05	6,31E-05	8,70E-05	8,62E-05	6,74E-05
-0,5966103	0,661306	-1,5681968	0,33723	0,509945	+	0,004499	A4HJR5	Uncharacterized protein	46,5	34,339	115,13	1,80E-05	1,96E-05	3,18E-05	1,57E-05	3,45E-05	1,36E-05	9,46E-06	1,03E-05	1,30E-05	1,21E-05
-4,5410868	0,042953	-6,1995128	0,013607	0,316785	+	0,006108	A4HJT2	Uncharacterized protein	4,8	26,827	3,397	1,13E-06	1,13E-06	0,00E+00	1,15E-06	1,28E-06	2,69E-07	4,72E-07	2,14E-07	2,18E-07	1,10E-06
-0,2693882	0,829671	-2,997261	0,125238	0,150948	+	1,25E-05	A4HT3	Putative farnesyltransferase (EC 2.5.1.21)	47,8	47,176	200,09	4,19E-05	3,64E-05	2,83E-05	4,34E-05	4,89E-05	5,01E-06	3,60E-06	6,11E-06	1,06E-05	6,21E-06
-2,21773	0,214979	0,6775249	1,599393	7,439754	+	9,59E-07	A4HJV0;A4	Iron/zinc transporter protein-like protein	18,5	45,198	31,573	1,28E-05	7,70E-06	9,29E-06	7,07E-06	1,34E-05	6,01E-05	7,49E-05	6,37E-05	7,39E-05	9,25E-05
-1,9725418	0,254804	-3,361379	0,097303	0,381872	+	0,000344	A4HJX2	Uncharacterized protein	31,4	57,795	115,4	1,73E-05	1,32E-05	1,20E-05	1,40E-05	1,81E-05	7,60E-06	4,78E-06	4,35E-06	3,78E-06	6,01E-06
-1,5245214	0,347595	-1,0937039	0,468557	1,347997	+	0,006128	A4HJZ2	Putative serine/threonine protein kinase	37,1	114,66	264,82	4,24E-05	4,20E-05	3,45E-05	4,16E-05	3,92E-05	5,09E-05	5,32E-05	4,71E-05	4,97E-05	7,07E-05
-3,3042208	0,101235	-5,7779666	0,018225	0,180023	+	0,002319	A4HK34	Uncharacterized protein	25,1	43,521	23,533	1,96E-06	7,32E-06	6,33E-06	7,75E-06	2,35E-06	5,09E-07	2,04E-06	8,77E-07	6,40E-07	5,28E-07
-0,5950521	0,662021	-1,6988854	0,308024	0,465279	+	0,007046	A4HK38	Putative RNA helicase	42,5	64,893	102,62	3,70E-05	5,62E-05	8,00E-05	5,33E-05	2,50E-05	1,74E-05	2,43E-05	1,69E-05	2,01E-05	2,31E-05
0,77845488	1,715293	1,7384682	3,336807	1,945328	+	0,000311	A4HK50	Putative ubiquitin carrier protein 4 (EC 6.3.2.19)	41,2	26,247	53,653	4,27E-05	4,34E-05	3,85E-05	5,54E-05	4,67E-05	6,73E-05	1,07E-04	8,26E-05	1,09E-04	7,96E-05
-1,4366737	0,369418	-3,2970544	0,101739	0,275404	+	0,00223	A4HK54	Uncharacterized protein	42	65,326	323,31	3,27E-05	1,14E-05	2,21E-05	3,05E-05	3,26E-05	6,46E-06	1,02E-05	3,34E-06	5,65E-06	1,05E-05
-2,9013154	0,13385	-4,5588724	0,042427	0,316975	+	0,001076	A4HK95	Uncharacterized protein (Fragment)	20,1	113,91	68,572	2,10E-05	1,51E-05	8,99E-06	1,61E-05	1,81E-05	6,32E-06	8,39E-06	3,14E-06	4,29E-06	3,68E-06
0,63854558	1,565759	1,1245509	2,180337	1,400562	+	0,00674	A4HKB3	Uncharacterized protein	55,5	53,144	323,31	7,92E-05	9,03E-05	6,98E-05	8,79E-05	8,90E-05	1,15E-04	1,12E-04	9,16E-05	1,20E-04	1,50E-04
-0,5659696	0,675501	-2,5265436	0,173554	0,256926	+	0,001761	A4HKD6	Uncharacterized protein	59,2	25,631	179,86	1,37E-05	2,36E-05	1,31E-05	1,29E-05	1,54E-05	6,83E-06	6,89E-06	2,10E-06	2,01E-06	4,70E-06
0,59396476	1,509389	0,3146668	1,243724	0,823992	+	0,006096	A4HKG9	Uncharacterized protein	60,6	70,903	323,31	1,05E-04	1,13E-04	1,06E-04	1,04E-04	1,07E-04	8,99E-05	9,89E-05	8,12E-05	7,57E-05	9,75E-05
-4,8796446	0,033969	-3,1752684	0,1107	3,25888	+	0,000272	A4HK11	Uncharacterized protein	14,4	49,991	9,0802	2,19E-06	1,99E-06	1,12E-06	2,14E-06	1,35E-06	4,94E-06	4,58E-06	6,24E-06	4,16E-06	8,87E-06
0,00845031	1,005874	0,3345007	1,260941	1,253577	+	0,007075	A4HKL0	Small nuclear ribonucleoprotein component-like protein	55,8	110,87	323,31	1,05E-04	1,15E-04	9,66E-05	1,23E-04	1,21E-04	1,26E-04	1,50E-04	1,34E-04	1,30E-04	1,59E-04
1,3459942	2,542053	1,9236794	3,793894	1,492453	+	0,005697	A4HKN8	Uncharacterized protein	55,1	14,696	131,36	4,05E-05	3,29E-05	4,42E-05	3,37E-05	3,68E-05	5,72E-05	6,85E-05	5,03E-05	6,58E-05	4,17E-05
-2,1409436	0,226731	-1,687474	0,31047	2,369329	+	0,006237	A4HKN9	Uncharacterized protein	33,3	136,69	323,31	2,39E-05	3,06E-05	3,46E-05	3,50E-05	4,03E-05	4,69E-05	3,57E-05	4,51E-05	4,53E-05	
-0,6105162	0,654962	-0,1433716	0,905401	1,382371	+	0,005881	A4HKP4	Uncharacterized protein	49,8	75,355	190,61	5,02E-05	5,52E-05	4,99E-05	4,36E-05	4,86E-05	5,73E-05	7,98E-05	7,86E-05	5,56E-05	7,41E-05
-0,1186075	0,921076	-1,0903078	0,469661	0,509905	+	0,001748	A4HKQ1	Uncharacterized protein	54,3	106,85	323,31	6,76E-05	1,11E-04	1,55E-04	8,04E-05	9,88E-05	5,17E-05	5,51E-05	4,89E-05	5,11E-05	4,47E-05
-0,9039666	0,534415	-0,0429297	0,970682	1,816343	+	0,00394	A4HKQ5	CD protein (EC 4.4.1.1)	36,6	44,078	126,97	2,74E-05	1,83E-05	2,72E-05	1,65E-05	3,23E-05	4,66E-05	3,94E-05	4,49E-05	3,36E-05	5,17E-05
-1,9988016	0,250208	-1,2567723	0,418479	1,675257	+	0,000921	A4HKS7	Uncharacterized protein	38,9	80,293	167,32	1,80E-05	1,92E-05	2,04E-05	1,98E-05	2,35E-05	4,39E-05	3,74E-05	2,97E-05	2,60E-05	3,37E-05
-2,9629332	0,128253	-2,2994164	0,203145	1,583939	+	0,004382	A4HKT0	Uncharacterized protein	23,6	45,853	45,205	4,64E-06	7,17E-06	4,58E-06	6,68E-06	6,94E-06	7,56E-06	1,08E-05	9,57E-06	8,95E-06	9,98E-06
-1,9999134	0,250015	-2,9588806	0,128614	0,514425	+	0,000288	A4HKT6	Uncharacterized protein	47,1	68,003	202,14	1,82E-05	2,28E-05	1,39E-05	1,60E-05	1,54E-05	9,55E-06	6,78E-06	5,84E-06	9,40E-06	9,89E-06
5,0196814	32,43954	5,3994544	42,20829	1,301137	+	0,00259	A4HKX6	Dihydrolipoyl dehydrogenase (EC 1.8.1.4)	79,6	50,502	323,31	1,65E-03	1,56E-03	1,94E-03	1,65E-03	1,43E-03	2,21E-03	2,41E-03	2,06E-03	2,06E-03	1,95E-03
-3,179847	0,11035	-5,401956	0,022873	0,20728	+	0,00118	A4HX7	Putative cyclin 6	32,7	35,161	78,092	2,85E-06	3,29E-06	3,96E-06	4,37E-06	5,41E-06	6,20E-07	2,09E-06	0,00E+00	0,00E+00	1,06E-06
-4,0555332	0,06014	-2,4884558	0,178197	2,963039	+	1,45E-05	A4HKY1	Uncharacterized protein	27,3	79,809	158,19	4,41E-06	3,37E-06	4,94E-06	6,32E-06	5,50E-06	1,46E-05	1,44E-05	1,28E-05	1,30E-05	1,66E-05
-0,9416383	0,520641	-0,3193759	0,801416	1,539287	+	0,002476	A4HKY9	Putative exosome-associated protein 2 (EC 3.1.13.-)	38,1	33,018	168,11	2,05E-05	1,88E-05	1,46E-05	1,61E-05	1,66E-05	2,80E-05	3,20E-05	3,00E-05	2,13E-05	2,27E-05
1,450926	2,733835	-0,1138433	0,924123	0,338032	+	1,82E-07	A4HL05;A4	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase-like protein	54,4	38,965	304,21	1,05E-04	1,07E-04	1,14E-04	8,70E-05	3,46E-05	3,82E-05	3,27E-05	3,67E-05	3,28E-05	
-1,8492336	0,27754	-1,1889713	0,438616	1,58037	+	0,007431	A4HL57	Putative zinc carboxypeptidase	27,1	161,65	224,19	4,25E-05	4,80E-05	5,13E-05	3,79E-05	8,32E-05	6,93E-05	6,36E-05	4,95E-05	9,88E-05	
-3,7681854	0,073394	-5,9036638	0,016704	0,227592	+	0,00325	A4HL65	Putative glucose transporter/membrane transporter D2	8,1	66,96	90,097	5,67E-06	8,86E-06	2,19E-06	4,24E-06	6,14E-06	1,87E-06	8,04E-07	1,23E-06	4,72E-07	
7,0790586	135,2101	6,8678594	116,797	0,863819	+	0,006057	A4HL70	Heat shock protein 83-1	81,5	80,662	323,31	1,06E-02	1,14E-02	1,14E-02	9,94E-03	1,13E-02	9,41E-03	9,23E-03	1,05E-02	8,79E-03	9,25E-03
-2,5114646	0,175377	-4,6769314	0,039093	0,22291	+	0,007444	A4HL79	Uncharacterized protein	21,4	23,786	77,164	3,57E-06	4,71E-06	2,35E-06	5,23E-06	6,11E-06	1,70E-06	0,00E+00	9,67E-07	1,21E-06	1,66E-06
-0,7337518	0,601338	-1,891996	0,877092	1,458568	+	0,000548	A4HLA5	Uncharacterized protein	56	155,03	323,31	1,02E-04	7,63E-05	9,04E-05	1,07E-04	9,33E-05	1,42E-04	1,51E-04	1,37E-04	1,26E-04	1,26E-04
-3,9114722	0,066455	-2,954816	0,128977	1,940806	+	0,003868	A4HLE9	Uncharacterized protein	14,4	121,52	133,55	9,26E-06	7,95E-06	6,92E-06	8,76E-06	7,70E-06	8,53E-06	2,08E-05	1,68E-05	1,68E-05	1,88E-05
0,26002362	1,197498	0,6821493	1,604528	1,3399	+	0,00645	A4HLF1	Putative nicotinate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.11)	52,8	47,042	123,77	4,81E-05	6,81E-05	5,97E-05	5,42E-05	5,37E-05	7,42E-05	8,89E-05	6,84E-05	6,61E-05	8,14E-05
3,7051274	13,04231	3,0766106	8,436301	0,646841	+	0,00073	A4HLG1	Uncharacterized protein	77	28,176	323,31	4,20E-04	3,75E-04	3,63E-04	3,40E-04	3,43E-04	1,97E-04	2,66E-04	2,22E-04	2,20E-04	2,95E-04
-0,8490404	0,555154	-2,0467844	0,242023	0,435956	+	9,82E-05	A4HLH3	Putative 33 kDa inner dynein arm light chain,axonemal	69,9	45,979	323,31	2,22E-05	2,55E-05	1,97E-05	3,16E-05	3,08E-05	1,04E-05	9,25E-06	1,16E-05	1,43E-05	1,08E-05
-0,9911658	0,503071	-0,3249616	0,79832	1,586892	+	0,002618	A4HLJ0	Putative expression-site associated gene (ESAG3)	39,5	73,119	104,4	3,44E-05	3,10								

-0,178998	0,883316	0,867646	1,824683	2,065719	+	1,91E-05	A4HM08	Uncharacterized protein	49	130,14	323,31	1,09E-04	1,18E-04	1,44E-04	9,29E-05	1,17E-04	2,62E-04	2,14E-04	2,20E-04	2,47E-04	
1,9587528	3,887258	2,858458	7,252397	1,865685	+	6,22E-05	A4HM35	Delta-12 fatty acid desaturase	32,7	45,973	182,66	1,56E-04	1,62E-04	1,81E-04	1,96E-04	2,03E-04	3,00E-04	3,78E-04	2,75E-04	3,76E-04	3,50E-04
-4,9724278	0,031853	-3,9045692	0,066774	2,096319	+	0,00706	A4HM51	Uncharacterized protein	8,9	50,387	6,6899	0,00E+00	2,23E-06	1,83E-06	2,39E-06	1,27E-06	2,78E-06	3,62E-06	2,83E-06	4,13E-06	3,67E-06
-1,3705832	0,386735	-0,9152697	0,530245	1,371081	+	0,005749	A4HM54	Uncharacterized protein	29,3	31,598	38,838	1,20E-05	1,11E-05	1,34E-05	1,19E-05	1,29E-05	1,79E-05	1,33E-05	1,50E-05	1,78E-05	2,08E-05
-1,9801522	0,253463	-3,5239752	0,086932	0,342975	+	0,002329	A4HM57	Uncharacterized protein	39,1	98,602	149,56	3,07E-05	2,64E-05	3,40E-05	2,01E-05	1,76E-05	1,48E-05	1,03E-05	5,88E-06	4,73E-06	1,08E-05
0,72681568	1,654982	0,4778613	1,392768	0,841506	+	0,002187	A4HM61	Uncharacterized protein	53,2	30,913	274,54	5,29E-05	4,97E-05	5,15E-05	4,84E-05	5,31E-05	4,64E-05	4,31E-05	4,60E-05	3,84E-05	4,20E-05
-2,7304374	0,15068	-1,3555486	0,390786	2,593479	+	0,005922	A4HMD4	Uncharacterized protein	25	34,728	134,03	7,17E-06	5,97E-06	1,99E-06	6,95E-06	6,19E-06	1,35E-05	1,38E-05	1,71E-05	1,36E-05	1,06E-05
3,356832	10,24489	4,0911914	17,04399	1,663659	+	0,000701	A4HME4	Putative short chain dehydrogenase	67,4	24,829	323,31	2,80E-04	2,19E-04	3,04E-04	2,30E-04	2,48E-04	3,79E-04	4,17E-04	5,53E-04	3,63E-04	4,30E-04
-1,2022217	0,434605	-3,0568672	0,120169	0,276501	+	4,28E-05	A4HMF9	Uncharacterized protein	70	13,813	43,408	4,94E-06	7,25E-06	5,17E-06	5,23E-06	8,04E-06	2,25E-06	1,34E-06	1,30E-06	1,43E-06	2,24E-06
4,6628106	25,33062	4,1878814	18,22544	0,719502	+	8,02E-07	A4HMG0	Putative mitochondrial processing peptidase, beta subunit (EC 1.10.2.2)	83,5	54,334	323,31	1,33E-03	1,37E-03	1,45E-03	1,37E-03	1,36E-03	1,05E-03	9,59E-04	1,03E-03	9,46E-04	9,80E-04
3,8485104	14,40513	3,4064028	10,60302	0,736059	+	0,000151	A4HMH5	Putative reiske iron-sulfur protein (EC 1.10.2.2)	54,2	33,774	323,31	4,95E-04	4,87E-04	4,58E-04	4,49E-04	5,46E-04	3,58E-04	3,31E-04	3,92E-04	3,41E-04	3,72E-04
-4,0229796	0,061512	-2,9993422	0,125057	2,033038	+	0,005784	A4HMI0	Uncharacterized protein	23	65,865	44,833	3,17E-06	3,20E-06	4,46E-06	3,95E-06	6,12E-06	1,30E-05	6,12E-06	5,95E-06	9,53E-06	8,35E-06
-1,8800342	0,271677	-1,2023432	0,434569	1,599578	+	0,000269	A4HMJ4	Putative ubiquitin hydrolase	34,5	133,31	216,73	3,58E-05	2,91E-05	4,17E-05	3,83E-05	3,75E-05	6,11E-05	5,96E-05	4,94E-05	5,61E-05	6,47E-05
1,6718272	3,186179	1,2487056	2,376281	0,745809	+	0,004698	A4HMK2	Trypanin-like protein	73,6	53,344	323,31	1,83E-04	1,81E-04	1,32E-04	1,66E-04	1,94E-04	1,45E-04	1,21E-04	1,25E-04	1,23E-04	1,23E-04
6,3725586	82,8574	6,0844426	67,85779	0,818971	+	0,005402	A4HMM1	40S ribosomal protein S6	68,6	28,321	323,31	2,33E-03	2,46E-03	2,33E-03	2,17E-03	2,45E-03	1,99E-03	1,88E-03	1,61E-03	2,11E-03	2,06E-03
0,08401962	1,059967	-1,5954631	0,330916	0,312195	+	0,003436	A4HMNO	Uncharacterized protein	25,5	101,37	197,36	1,54E-04	1,45E-04	1,47E-04	5,96E-05	7,32E-05	2,41E-05	6,86E-05	2,22E-05	3,62E-05	3,19E-05
-1,5445802	0,342795	-3,1217372	0,114885	0,335142	+	0,007152	A4HMNS	Uncharacterized protein (Fragment)	53,2	47,573	129,19	9,15E-06	2,15E-05	1,52E-05	2,34E-05	1,66E-05	3,51E-06	1,01E-05	2,56E-06	7,12E-06	7,50E-06
0,75810224	1,691264	2,0789274	4,22493	2,498089	+	0,00029	A4HMN7	Uncharacterized protein	41,8	48,468	267,11	1,06E-04	9,42E-05	4,92E-05	1,02E-04	7,53E-05	2,00E-04	2,36E-04	1,84E-04	1,86E-04	2,23E-04
-6,8736498	0,008528	-9,0758682	0,029594	3,470351	+	0,000316	A4HMR5	Putative ubiquitin hydrolase	8,1	103,6	19,415	7,83E-07	1,38E-06	1,11E-06	6,66E-07	6,70E-07	2,04E-06	4,35E-06	2,32E-06	3,84E-06	3,43E-06
-0,5108022	0,701832	-1,9161546	0,26496	0,377526	+	0,002213	A4HMS0	Uncharacterized protein	38,6	44,271	146,36	2,66E-05	3,60E-05	2,43E-05	4,09E-05	3,04E-05	1,18E-05	5,41E-06	1,33E-05	1,65E-05	1,55E-05
-1,1506311	0,450428	-2,326236	0,199404	0,442698	+	0,001392	A4HMS1	Uncharacterized protein	58,2	38,053	105,66	1,56E-05	2,00E-05	1,28E-05	1,63E-05	2,27E-05	8,04E-06	1,08E-05	8,85E-06	6,85E-06	4,74E-06
-3,702559	0,07681	-5,7132092	0,019061	0,248161	+	0,002656	A4HMT2	Uncharacterized protein	12,6	81,482	27,567	8,00E-06	7,31E-06	3,56E-06	6,23E-06	7,42E-06	2,11E-06	5,19E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
-0,534133	0,690574	0,0714511	1,050773	1,521595	+	0,002267	A4HMV1	Putative aminotransferase	44,5	48,649	295,34	3,25E-05	4,74E-05	3,14E-05	2,93E-05	3,02E-05	4,93E-05	5,52E-05	4,89E-05	5,65E-05	4,66E-05
-1,2962963	0,40717	-4,702898	0,054112	0,132899	+	0,006943	A4HMV3	Uncharacterized protein	33,3	18,041	105,21	5,11E-06	1,39E-05	1,19E-05	7,82E-06	3,26E-06	2,94E-06	1,20E-06	1,35E-06	0,00E+00	1,22E-06
0,27411572	1,209253	0,2660011	1,631955	1,349556	+	0,002535	A4HMV7	Uncharacterized protein	45,6	82,37	323,31	1,18E-04	1,11E-04	8,73E-05	8,89E-05	9,66E-05	1,43E-04	1,48E-04	1,27E-04	1,22E-04	1,33E-04
2,2124448	4,6346	2,5077052	5,687147	1,227106	+	0,001706	A4HMX3	Putative ubiquitin-activating enzyme e1	60,4	127,15	323,31	5,79E-04	5,78E-04	6,18E-04	5,86E-04	5,86E-04	7,22E-04	8,29E-04	6,66E-04	7,54E-04	6,57E-04
-4,4399398	0,046263	-2,7968734	0,143899	3,110444	+	0,002309	A4HMY6	Uncharacterized protein	17,1	95,849	94,197	3,94E-06	9,60E-06	3,68E-06	4,11E-06	3,00E-06	1,40E-05	1,87E-05	2,01E-05	1,15E-05	8,24E-06
2,1376798	4,400538	0,5277801	1,441709	0,327621	+	2,62E-06	A4HN23	Uncharacterized protein	75,1	24,326	182,92	8,84E-05	1,10E-04	1,09E-04	1,09E-04	1,22E-04	4,33E-05	2,82E-05	3,01E-05	3,86E-05	3,72E-05
3,5734126	11,90431	3,9915996	15,90711	1,336247	+	0,006969	A4HN71	Protein kinase A catalytic subunit isoform 1	64,5	42,214	323,31	5,94E-04	5,38E-04	4,43E-04	4,03E-04	5,62E-04	6,91E-04	6,11E-04	6,62E-04	6,53E-04	7,44E-04
4,99292958	31,84356	4,6606998	25,29359	0,794308	+	0,002381	A4HN85	Polyadenylate-binding protein (PABP)	78,2	64,324	323,31	1,87E-03	2,04E-03	2,35E-03	2,07E-03	1,94E-03	1,62E-03	1,59E-03	1,63E-03	1,84E-03	1,48E-03
0,4178733	1,335957	0,1140297	1,082247	0,810091	+	0,006805	A4HNA4	Uncharacterized protein	33,7	146,06	318,79	2,13E-04	1,91E-04	1,76E-04	2,13E-04	1,85E-04	1,66E-04	1,35E-04	1,58E-04	1,74E-04	1,62E-04
0,07013382	1,049814	-1,4868872	0,356782	0,339852	+	3,33E-06	A4HNC2	Uncharacterized protein	44,4	161,72	323,31	1,75E-04	1,66E-04	1,66E-04	2,00E-04	1,45E-04	5,02E-05	6,72E-05	4,53E-05	6,51E-05	6,41E-05
1,0771486	2,109862	-0,2119478	0,863371	0,409207	+	9,33E-06	A4HND1	Uncharacterized protein	44,7	13,584	24,84	2,42E-05	3,68E-05	2,63E-05	2,80E-05	2,96E-05	1,23E-05	5,47E-06	1,17E-05	1,22E-05	1,33E-05
2,0311756	4,087378	1,4129108	2,662739	0,651454	+	7,06E-05	A4HND6	Kinesin-like protein	49,4	53,445	323,31	2,14E-04	2,14E-04	2,01E-04	2,28E-04	2,37E-04	1,51E-04	1,65E-04	1,34E-04	1,24E-04	1,41E-04
-1,0957903	0,46788	-1,9521742	0,258426	0,552335	+	0,002701	A4HNF1	Uncharacterized protein	47,3	113,69	323,31	5,10E-05	4,62E-05	5,22E-05	5,36E-05	6,47E-05	4,21E-05	3,80E-05	2,36E-05	2,45E-05	2,37E-05
2,7863394	6,898771	1,8065504	3,498049	0,507054	+	7,17E-05	A4HNF7	Uncharacterized protein	48,5	23,005	318,38	1,41E-04	1,46E-04	1,68E-04	1,64E-04	1,77E-04	7,14E-05	8,80E-05	6,75E-05	9,73E-05	7,36E-05
0,46902921	1,384178	-1,4870036	0,356753	0,257736	+	1,55E-05	A4HNG1	Inositol phosphorylceramide synthase (EC 2.7.8.27)	33,3	43,188	50,833	6,36E-05	6,18E-05	4,26E-05	6,83E-05	6,70E-05	1,97E-05	1,10E-05	1,22E-05	1,76E-05	1,87E-05
3,2693358	9,642023	2,9924398	7,958187	0,825365	+	0,00051	A4HNG6	Polyadenylate-binding protein (PABP)	77,8	62,208	323,31	5,93E-04	5,77E-04	6,30E-04	5,81E-04	6,23E-04	5,38E-04	4,57E-04	4,91E-04	5,19E-04	4,75E-04
0,4481664	1,364305	1,5075936	2,843354	2,084104	+	7E-06	A4HNG9	Uncharacterized protein	42,9	19,14	56,087	2,70E-05	2,43E-05	2,83E-05	2,35E-05	2,78E-05	5,41E-05	6,28E-05	4,34E-05	5,63E-05	5,75E-05
-1,820295	0,283163	-1,1626379	0,446695	1,577519	+	0,005081	A4HNJ3	Uncharacterized protein	47,1	56,827	153,95	1,25E-05	1,57E-05	1,53E-05	1,88E-05	1,91E-05	3,21E-05	1,97E-05	2,97E-05	2,18E-05	2,57E-05
3,722523	13,20052	3,4096666	10,62705	0,805048	+	0,000939	A4HNJ4	Putative isopentenyl-diphosphate delta-isomerase (EC 5.3.3.2)	77,3	39,42	323,31	5,13E-04	5,58E-04	4,86E-04	5,48E-04	5,01E-04	4,60E-04	3,85E-04	4,28E-04	4,28E-04	3,94E-04
-0,5662858	0,675353	-1,8678714	0,273977	0,40568	+	0,000177	A4HNN2	Uncharacterized protein	35,3	25,643	30,61	1,82E-05	2,35E-05	1,59E-05	1,66E-05	1,37E-05	7,92E-06	8,12E-06	4,72E-06	6,83E-06	8,26E-06
1,5992188	3,029792	0,8152759	1,759635	0,580777	+	0,000286	A4HNQ8	Putative DNAJ domain protein	60,8	56,128	323,31	1,60E-04	2,02E-04	1,38E-04	1,97E-04	1,62E-04	1,07E-04	8,61E-05	1,16E-04	9,42E-05	9,34E-05
-0,9759305	0,508412	-2,4190924	0,186974	0,36776	+	0,001077	A4HNR5	Cell division related protein kinase 2 (EC 2.7.11.1)	37,6	35,61	77,385	1,19E-05	2,10E-05	1,92E-05	1,59E-05	2,54E-05	6,42E-06	7,65E-06	9,41E-06	3,79E-06	7,51E-06
4,0912836	17,04508	3,6398712	12,465552	0,731327	+	0,006081	A4HNS0	Putative ubiquitin/ribosomal protein S27a	44,7	17,053	194,41	2,68E-04	3,17E-04	2,84E-04	2,78E-04	3,09E-04	2,35E-04	1,95E-04	2,50E-04	1,63E-04	2,32E-04
-4,0367208	0,060929	-2,6818194	0,155845	2,557796	+	0,003	A4HNS6	Uncharacterized protein	12,9	22,622	4,3246	1,19E-06									

0,0720796	1,051231	0,8603609	1,815492	1,727016	+	0,001942	A4HP90	Uncharacterized protein	10,6	55,744	13,907	4,50E-05	6,00E-05	6,25E-05	8,07E-05	5,06E-05	8,15E-05	1,14E-04	9,74E-05	9,82E-05	1,20E-04
0,23145461	1,174018	-0,6576564	0,633907	0,539947	+	6,18E-05	A4HP95	Guanylate kinase-like protein	48,8	36,119	63,594	3,80E-05	5,19E-05	3,88E-05	4,41E-05	4,08E-05	1,93E-05	2,41E-05	2,10E-05	2,42E-05	2,66E-05
1,4557062	2,742908	2,0815912	4,232738	1,543157	+	0,000854	A4HP96	Uncharacterized protein	45,5	50,261	323,31	1,27E-04	1,40E-04	1,19E-04	1,59E-04	1,49E-04	1,93E-04	2,16E-04	1,81E-04	2,18E-04	2,66E-04
4,0950812	17,09001	3,5436036	11,66087	0,682321	+	0,000138	A4HPA5	Methyltransferase (EC 2.1.1.-)	75,6	40,123	323,31	7,17E-04	7,17E-04	6,04E-04	6,49E-04	7,47E-04	5,10E-04	4,57E-04	4,45E-04	4,17E-04	5,17E-04
-4,0047616	0,062294	-3,3245824	0,099816	1,602339	+	0,002703	A4HPB2	Uncharacterized protein	27	75,757	64,483	4,65E-06	4,27E-06	5,75E-06	5,01E-06	4,09E-06	7,02E-06	6,64E-06	7,01E-06	6,93E-06	1,09E-05
-2,1732224	0,221715	-1,0522106	0,482229	2,174995	+	0,002387	A4HPB3	Putative acid phosphatase	24,1	50,534	76,973	9,87E-06	1,29E-05	1,01E-05	9,79E-06	1,40E-05	2,44E-05	3,09E-05	1,31E-05	2,95E-05	2,94E-05
-0,5767256	0,670484	-0,9682943	0,51111	0,7623	+	0,006933	A4HPB6	Chromatin assembly factor 1 subunit b-like protein	40,5	71,474	149,67	5,01E-05	4,55E-05	4,31E-05	4,94E-05	4,35E-05	3,56E-05	4,04E-05	3,53E-05	3,01E-05	4,25E-05
-1,1757736	0,442646	-0,2731286	0,827523	1,86949	+	0,001785	A4HPC1	Membrane-bound acid phosphatase	29,3	56,928	111,61	2,43E-05	3,00E-05	2,45E-05	2,86E-05	1,99E-05	3,32E-05	5,44E-05	4,26E-05	4,55E-05	6,59E-05
-2,0376396	0,243562	-1,5315884	0,345896	1,420158	+	0,000369	A4HPC4	Related to multifunctional cyclin-dependent kinase p085-like protein	28,3	111,89	80,809	2,85E-05	2,92E-05	2,39E-05	2,85E-05	2,64E-05	3,98E-05	4,33E-05	3,28E-05	3,77E-05	4,08E-05
-0,4805818	0,716689	-1,3030946	0,405256	0,565456	+	0,000403	A4HPC7	FPGS protein (EC 6.3.2.17)	57,9	58,179	142,25	4,20E-05	4,57E-05	3,62E-05	4,71E-05	3,85E-05	2,58E-05	1,73E-05	2,82E-05	2,55E-05	2,28E-05
-4,625055	0,040525	-6,6567636	0,009911	0,244565	+	0,002792	A4HPE6	Uncharacterized protein	15	95,201	27,266	6,39E-06	6,89E-06	3,76E-06	1,62E-06	3,19E-06	1,54E-06	1,02E-06	1,13E-06	4,55E-07	9,23E-07
-1,8840584	0,270921	-1,4064784	0,377231	1,392406	+	0,001626	A4HPE9	Putative pre-mRNA splicing factor ATP-dependent RNA helicase	34,6	122,717	159,63	3,28E-05	3,42E-05	2,85E-05	4,11E-05	3,11E-05	4,56E-05	4,86E-05	4,04E-05	4,76E-05	4,97E-05
1,6428972	3,122923	2,1820782	4,538068	1,453147	+	0,000899	A4HPF0	Uncharacterized protein	47,8	126,26	323,31	4,18E-04	3,25E-04	3,64E-04	4,21E-04	4,58E-04	5,42E-04	6,09E-04	5,03E-04	6,13E-04	6,06E-04
-4,386226	0,047821	-3,5326094	0,086413	1,807025	+	0,00475	A4HPF5	Putative ATP-binding cassette protein	11,3	74,356	34,347	3,19E-06	5,62E-06	2,52E-06	3,38E-06	3,72E-06	5,00E-06	6,48E-06	5,95E-06	7,82E-06	7,29E-06
0,67190148	1,593171	1,0894561	2,127938	1,335662	+	0,007043	A4HP13	Uncharacterized protein	52,6	37,977	165,86	7,34E-05	5,47E-05	5,68E-05	5,82E-05	6,16E-05	8,62E-05	9,54E-05	6,64E-05	8,40E-05	7,52E-05
-2,885713	0,135305	-1,1657921	0,445719	3,294183	+	2,13E-05	A4HP15	Uncharacterized protein	38,9	63,883	323,31	1,11E-05	8,93E-06	6,78E-06	8,83E-06	8,21E-06	2,55E-05	2,90E-05	2,03E-05	3,91E-05	3,19E-05
-4,7231618	0,037861	-3,1913254	0,109475	2,891537	+	0,004284	A4HP19	Putative oxidoreductase	24,3	58,523	48,93	4,76E-06	1,02E-06	2,19E-06	1,02E-06	1,76E-06	7,54E-06	5,97E-06	4,97E-06	8,07E-06	5,95E-06
1,6114348	3,055556	1,9868018	3,963574	1,297169	+	0,004014	A4HP14	Putative 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component (EC 1.2.4.2)	60	114,21	323,31	3,22E-04	3,53E-04	4,10E-04	3,46E-04	3,21E-04	4,29E-04	4,14E-04	4,20E-04	5,30E-04	4,82E-04
-1,8240198	0,282433	-3,0833636	0,117982	0,417734	+	0,002235	A4HP16	Uncharacterized protein	28,1	37,978	103,17	7,91E-06	1,26E-05	1,18E-05	1,37E-05	8,77E-06	6,09E-06	2,66E-06	4,47E-06	6,63E-06	3,75E-06
3,8077294	14,00363	4,2674682	19,2591	3,75293	+	0,000244	A4HPM6	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	90,7	35,414	323,31	4,87E-04	4,20E-04	5,51E-04	5,05E-04	5,22E-04	6,51E-04	7,35E-04	6,68E-04	7,01E-04	6,54E-04
-4,2789544	0,051512	-2,6402228	0,160403	3,113919	+	2,51E-06	A4HPN0	Uncharacterized protein	17	31,923	18,797	1,71E-06	1,39E-06	1,62E-06	2,01E-06	1,55E-06	4,01E-06	6,40E-06	5,29E-06	5,33E-06	4,84E-06
4,8441236	28,72278	3,8524126	14,44414	0,502881	+	0,001101	A4HPP5	Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	87,4	11,664	323,31	3,09E-04	4,69E-04	3,16E-04	2,44E-04	3,78E-04	1,54E-04	2,19E-04	1,95E-04	1,44E-04	1,43E-04
1,27945672	2,427475	0,6142263	1,530737	0,630588	+	0,003219	A4HPT4	Uncharacterized protein	52,9	72,068	323,31	1,70E-04	1,91E-04	1,38E-04	1,70E-04	2,15E-04	1,01E-04	1,37E-04	1,01E-04	1,31E-04	8,95E-05
-0,205988	0,866945	-0,8743089	0,545515	0,629239	+	0,002549	A4HPV7	ATP-dependent RNA helicase-like protein	51	109	257,54	9,64E-05	1,25E-04	7,74E-05	8,82E-05	9,21E-05	6,13E-05	4,67E-05	6,51E-05	5,53E-05	7,22E-05
1,5093864	2,846889	0,9324068	1,908457	0,670366	+	0,001103	A4HPW4	Putative chaperone protein Dnaj	62,9	30,79	323,31	8,73E-05	9,55E-05	7,94E-05	8,33E-05	9,41E-05	5,93E-05	4,60E-05	5,63E-05	6,51E-05	7,04E-05
0,37337722	1,295382	-0,580525	0,66872	0,516234	+	0,004986	A4HPW7	Uncharacterized protein	57,7	29,68	243,47	3,28E-05	3,53E-05	5,18E-05	3,02E-05	4,65E-05	2,28E-05	3,02E-05	1,89E-05	1,32E-05	1,79E-05
-1,571382	0,336486	-1,1736228	0,221653	0,65873	+	0,000466	A4HPX2	Related to elongation factor-2 kinase efk-1b isoform-like protein	37,1	126,72	255,89	4,04E-05	4,56E-05	3,46E-05	4,25E-05	5,22E-05	2,97E-05	2,66E-05	2,77E-05	2,63E-05	3,01E-05
2,2163562	4,647182	1,3467958	2,543466	0,547314	+	1,54E-05	A4HPY2	Putative 60S acidic ribosomal protein	59,9	25,451	323,31	1,21E-04	1,38E-04	1,13E-04	1,09E-04	1,13E-04	6,27E-05	2,63E-05	5,46E-05	6,47E-05	7,10E-05
-4,5290836	0,043312	-6,1061298	0,014517	0,335167	+	0,001188	A4HPY6	Uncharacterized protein	8,3	189,48	47,401	1,07E-05	7,68E-06	7,64E-06	7,35E-06	8,06E-06	3,52E-06	5,23E-06	2,27E-06	2,55E-06	1,48E-06
-3,907289	0,066648	-6,6401324	0,010026	0,150429	+	0,000364	A4HQ15	Uncharacterized protein	5,5	35,765	4,3015	3,70E-06	1,19E-06	2,83E-06	2,06E-06	3,00E-06	3,52E-07	7,84E-07	2,30E-07	1,92E-07	4,87E-07
-1,0664495	0,477493	-1,976746	0,254062	0,532076	+	0,000217	A4HQ22	Uncharacterized protein	49,1	48,556	112,05	2,20E-05	2,12E-05	2,14E-05	2,40E-05	2,81E-05	1,11E-05	1,16E-05	1,32E-05	1,18E-05	1,01E-05
3,1955226	9,161111	2,8402274	7,161329	0,78171	+	0,006167	A4HQ31	Kinesin-like protein	65	71,186	323,31	6,72E-04	6,92E-04	6,25E-04	5,91E-04	6,87E-04	5,81E-04	4,08E-04	5,35E-04	5,12E-04	5,29E-04
-5,2704986	0,025907	-4,1095582	0,057929	2,236031	+	0,004877	A4HQ44	Uncharacterized protein	17	121,16	61,155	3,42E-06	2,79E-06	2,39E-06	5,56E-06	2,42E-06	4,81E-06	1,04E-06	4,89E-06	5,59E-06	6,94E-06
1,7334698	3,325266	2,3528612	5,108364	1,536227	+	0,00177	A4HQ53	Putative NADH dehydrogenase (EC 1.6.99.3)	64,1	57,417	323,31	1,78E-04	1,65E-04	2,55E-04	1,91E-04	1,77E-04	2,88E-04	3,59E-04	2,95E-04	2,68E-04	2,65E-04
-0,2326353	0,851079	0,3262736	1,253771	1,473155	+	0,003779	A4HQ61	Uncharacterized protein	43,7	57,051	157,67	3,83E-05	5,97E-05	4,19E-05	5,97E-05	4,68E-05	6,72E-05	6,68E-05	7,16E-05	7,76E-05	7,52E-05
-2,6684502	0,157296	-1,9780592	0,253831	1,613721	+	0,004801	A4HQ62	Uncharacterized protein	31,9	90,037	64,402	1,29E-05	1,80E-05	1,10E-05	1,83E-05	1,21E-05	2,22E-05	2,07E-05	2,12E-05	2,29E-05	2,94E-05
2,556216	5,88163	2,9011672	7,470305	1,270108	+	0,000738	A4HQ78	Putative isoleucyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.5)	65,7	126,19	323,31	6,70E-04	7,71E-04	7,37E-04	7,72E-04	7,66E-04	9,12E-04	9,35E-04	8,46E-04	9,83E-04	1,05E-03
-1,735664	0,300271	-5,8519506	0,017314	0,05766	+	0,006819	A4HQ85	Uncharacterized protein	10,6	37,235	4,1288	4,26E-05	1,31E-06	9,55E-06	1,87E-05	1,76E-05	1,00E-06	1,36E-07	1,69E-06	1,59E-06	1,93E-07
4,480184	22,31874	3,9312932	15,25588	0,683545	+	0,000563	A4HQ98	Mkia0324 protein-like protein	58,8	56,901	246,68	1,24E-03	1,57E-03	1,06E-03	1,22E-03	1,31E-03	8,81E-04	8,31E-04	8,32E-04	8,44E-04	9,63E-04
5,1185978	34,74173	4,9203014	30,28017	0,871579	+	0,004623	A4HQA3	Uncharacterized protein	80	57,622	323,31	2,02E-03	1,92E-03	2,01E-03	1,95E-03	2,11E-03	1,65E-03	1,61E-03	1,85E-03	1,75E-03	1,89E-03
2,0017954	4,004981	1,4293188	2,693195	0,672461	+	0,002172	A4HQB1	Uncharacterized protein	81,8	33,763	323,31	1,22E-04	1,68E-04	1,42E-04	1,48E-04	1,05E-04	9,42E-05	9,79E-05	9,55E-05	8,03E-05	8,77E-05
-1,6026288	0,329276	-2,293518	0,203978	0,619472	+	0,000127	A4HQC0	Uncharacterized protein	29,1	69,097	78,982	2,41E-05	2,22E-05	1,89E-05	2,20E-05	2,75E-05	1,47E-05	1,31E-05	1,41E-05	1,33E-05	1,56E-05
-2,700343	0,153856	-2,291183	0,204308	1,327912	+	0,002886	A4HQC7	Putative rab-like GTPase activating protein	24,9	49,318	21,72	7,70E-06	7,97E-06	8,42E-06	6,56E-06	7,41E-06	1,09E-05	9,12E-06	1,12E-05	1,06E-05	8,69E-06
1,16232844	2,238184	0,2979055	1,229358	0,549266	+	0,001932	A4HQD8	Uncharacterized protein	66,5	28,453	127,21	8,40E-05	5,54E-05	6,48E-05	6,02E-05	5,75E-05	4,79E-05	3,35E-05	4,03E-05	3,25E-05	2,49E-05
0,2840146	1,217578	-0,521831	0,696487	0,572027	+	0,00222	A4HQD9	Uncharacterized protein	55,1	21,205	44,952	2,56E-05	2,99E-05	2,18E-05	2,29E-05	3,00E-05	1,89E-05	1,18E-05	1,94E-05	1,21E-05	1,34E-05
0,03539361	1,024836	-1,5214442	0,348337	0,339895	+	5,11E-05	A4HQF9	Methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.5.1.20)													

-0,0063995	0,995574	0,6048928	1,520866	1,527627	+	0,001351	E9AIX0	Uncharacterized protein	66	43,245	323,31	3,24E-05	4,62E-05	4,90E-05	4,65E-05	4,34E-05	6,89E-05	6,78E-05	5,80E-05	5,99E-05	7,55E-05
2,1408964	4,41036	2,9331342	7,637679	1,731759	+	3,17E-05	Q2V6T4	Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8)	61,7	47,176	323,31	2,02E-04	1,99E-04	2,29E-04	1,96E-04	2,16E-04	3,67E-04	4,42E-04	3,63E-04	3,24E-04	3,17E-04
1,7300876	3,31748	2,3199248	4,993062	1,505077	+	0,0025	tr A4H5E6	#N/D	32,7	47,975	323,31	1,90E-04	1,58E-04	1,30E-04	1,62E-04	1,63E-04	2,22E-04	1,98E-04	3,05E-04	2,37E-04	2,48E-04
6,6328382	99,2392	6,967037	125,1086	1,260677	+	0,003781	tr A4H7T6	#N/D	92,3	46,106	323,31	4,60E-03	4,50E-03	5,19E-03	4,13E-03	4,49E-03	5,43E-03	6,77E-03	5,79E-03	5,71E-03	5,26E-03
1,6999538	3,248906	0,614671	1,531209	0,4713	+	1,62E-05	tr A4HJ07	#N/D	20,6	55,326	28,159	1,45E-04	1,65E-04	1,90E-04	2,13E-04	1,95E-04	9,73E-05	9,19E-05	8,13E-05	7,78E-05	7,68E-05
0,31503668	1,244043	-0,8214373	0,565878	0,45487	+	0,002053	tr A4HJ10	#N/D	37,8	56,074	219,65	1,04E-04	5,41E-05	5,15E-05	7,42E-05	7,70E-05	4,20E-05	3,51E-05	2,06E-05	3,05E-05	3,48E-05

MC: média das concentrações de proteína dos parasitos cultivados na ausência de DIP; MT: média das concentrações de proteína dos parasitos cultivados na presença de DIP (100 µM por 24 h); T/C: razão do Antilog2 dos parasitos cultivados na presença de DIP sobre o Antilog2 daqueles cultivados na ausência de DIP; ID: código da proteína UNIPROT; MM: massa molecular; PMA: proteína mais abundante; CS: cobertura de sequencia

8.3. Proteínas identificadas na secreção de *L. (V.) braziliensis* após 6 h de incubação em meio condicionado (RPMI).

Anexo 4. Proteínas identificadas na secreção de *L. (V.) braziliensis* após 6 h de incubação em meio condicionado. As secreções dos promastigotas foram coletadas e separadas por SDS-PAGE. O gel foi dividido em 8 seções contendo diversas bandas que foram extraídas, descoradas, reduzidas, alquiladas e digeridas. Os peptídeos foram identificados por espectrometria de massas (LC-MS/MS) usando a base de dados Uniprot.

ID	PI	NA	MM (Da)	NP	NS	C	D	O
A4H3U2	R.NANPQACEVEHCNTCVSGDSTR.C R.LCAECDAGYSLAADATSCR.N R.VAFCSTCATAAADTCIK.C R.LSDTCAVPNCK.K	466	48975,9	4	6	0,15	Surface antigen-like protein (Fragment)	Leishmania braziliensis
A4HE26	K.HVVFQQVLEGEYVVK.A R.VIPEFM(+15.994900)CQGGDFTAGNGTGGK.S K.GFGYSGCPFHR.V K.FNDEFAGK.A R.VTMELFADAVPK.T R.VTM(+15.994900)ELFADAVPK.T	177	18662,9	6	17	0,38	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC	Leishmania braziliensis
A4HMB3	K.M(+15.994900)VYGDAVELENLVAVQSLSGTGALSGLAK.L R.ANM(+15.994900)AALTHETALLLAQTINDAVR.S R.LVHLILNSELR.K K.NIHTYTYYPDK.T R.RIVYDELLR.L K.TPIYLSNPTWPNHNSIVK.G R.SEYTCPPAHGAR.L K.TVSLNFEGM(+15.994900)K.K R.DDNGIPYPLR.V R.LLIDM(+15.994900)NPDYEYLPISGYQPFIDEAVK.M	409	45631,2	10	12	0,39	Putative aspartate aminotransferase (E	Leishmania braziliensis
A4H7T3	R.GAALDVFEVEPLPK.D K.ADNDGIVLILGR.S K.LSGSVSAIVSGTDASR.F	336	37119,7	3	3	0,13	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HG53	R.DSLSGYGAVALIVTK.E K.LHIVNDSVVYGLTGLR.T K.ECFVIISDKR.L K.AFAAM(+15.994900)IESM(+15.994900)LYEAR.F R.FGPWFVEPVIGSIDK.S	205	22523,2	5	6	0,34	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.11.4)	Leishmania braziliensis
A4HPA3	R.LAQLICGANSICQEIAR.T K.SVCDSYGFECR.Y	449	49842,8	4	5	0,13	TAT protein (EC 2.6.1.5)	Leishmania braziliensis

A0A088RUX4	K.AFVIINPSNPCGSNFSR.A K.FNGYPPPTSGTSHLR.Q	225	25607,8	4	4	0,24 Probable methylthioribulose-1-phosph	Leishmania panamensis
A4HGD1	K.M(+15.994900)GDNYVAPSGVQK.E K.SNEIFVLNSSQDIVEEPR.T K.M(+15.994900)SECTPLFFNAYR.M R.YPESCAVLVR.R	575	62927,6	2	2	0,05 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4H563	R.EGLGYSVTK.G K.AFGGGPCVTTLEK.A K.TAAENYIAR.L R.SAIFYNDEQK.T	176	19624,5	4	5	0,24 Putative methionine-S-sulfoxide reduct	Leishmania braziliensis
A0A088RKI4	R.FSCIVPEVEK.L R.IENFPNCVFNANR.L K.GLGHTVPEIILPK.T K.TAFLCVDLQK.A K.LLKEEPIPL.-	192	21527,3	5	5	0,24 Ribonuclease mar1	Leishmania panamensis
A4HGZ4	K.NSLTTLPM(+15.994900)GGGK.G K.FLAFEQTFK.N R.VQFNSAIGPYK.G	452	49420,7	3	3	0,07 Glutamate dehydrogenase	Leishmania braziliensis
A4HCQ1	K.TPTYGGYSDHIVVR.E	351	38261,9	1	1	0,04 Putative NADP-dependent alcohol dehy	Leishmania braziliensis
A4IB04	R.YALQLADPTVTSDATNGGDADEEGVPPM(+15.994900)VTVLR.R	507	55619,2	1	1	0,07 Uncharacterized protein	Leishmania infantum
A4HAX5	R.IVGLYQVTELGSELVR.D R.NQNPENVVVER.K R.KVSTILITLSR.N K.VSTILITLSR.N	198	21994,1	4	8	0,19 Contig, possible fusion of chromosome	Leishmania braziliensis
A4HJC7	K.GYTTLAIGVCIK.R R.LALQTNDFCGCLPASWLSSTLLVGVDSR.H R.ASFALSAEER.R K.IDQIDIFNM(+15.994900)K.T K.LYGPFPASWAQM(+15.994900)PSLER.L	673	70472,3	5	5	0,12 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4H6I8		538	57206,2	15	25	0,34 Putative aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	Leishmania braziliensis

	K.SVEVM(+15.994900)NTDAEGR.I R.LRSESAVEESAVSAYVQTCAK.F R.FYCPVAEALR.R R.VAFTNESVQGGK.S K.M(+15.994900)DM(+15.994900)GGSAGVFCAFIIVVR.S R.EGYTEVTVTALPATASR.T K.VSCVAAHVLLVGGALGQLR.D R.SESAVEESAVSAYVQTCAK.F K.HAGIYVSDAK.A K.SVCAAELEAICTSVQLCQR.L R.APAGAEAAIANAVAR.A K.SNVM(+15.994900)FTDISK.V R.YRNPHAATCAK.N K.GYGGIYAVGK.C K.M(+15.994900)DM(+15.994900)GGSAGVFCAF.I							
A4HD32		245	27010,6	5	5	0,23	Putative alanine racemase (EC 5.1.1.1)	Leishmania braziliensis
	K.AVCDTVAQESGNNR.R R.YDIASEPTAEALALNYK.A K.YIVGECPLLQLK.G K.SGTEPGEATVALAK.Y K.AVCDTVAQESGNRR.V							
A4HPP6		316	35812	3	3	0,13	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	R.DGTAYYFGNYTK.D R.TFQFSPGATYTGQYFGTK.K K.EM(+15.994900)GEIPPPSEVR.T							
A4HFX7		197	22082,9	2	2	0,13	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	R.AAQLSEEEAAVR.T K.LVFGISGDAPVPK.F							
E9AIE8		344	39291	4	4	0,15	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopent	Leishmania braziliensis
	R.LSPNVPGSYEALSEAR.V R.LILEGQGYFDVR.D K.EVSDDIEGFIQPLLK.K R.AIFLQLPVER.A							
A4H402		148	17011,7	1	1	0,11	Putative ubiquitin-conjugating enzyme	Leishmania braziliensis
	R.ECPPGITATPTNENPR.Y							
A4HIL9		115	13021,5	3	6	0,19	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	R.AM(+15.994900)ETQIPLATSTAVNPSKPAK.F R.AM(+15.994900)ETQIPLATSTAVNPSK.D R.AM(+15.994900)ETQIPLATSTAVNPSK.P							
A0A088RP82		359	38964,7	4	4	0,14	Cystathionine beta-synthase (EC 4.2.1.1)	Leishmania panamensis
	R.TETALPHDHPDSLIGVAR.R							

A0A088RI51	R.EEGLLVGSSGSAM(+15.994900)AGVLEAAK.D K.HGIQCEVVAK.C R.EGVVTRPTYEALAK.Q	247	27824,7	2	4	0,08	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.23.1)	Leishmania panamensis
A4HEP4	K.DSVQQESFALR.K R.LQLQQLLK.Y	266	29272,9	2	2	0,12	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4H4V1	R.IGDSVPELTALR.K R.TPSGLYVPPM(+15.994900)QPPYDAIDQR.L	622	68939	2	2	0,04	Putative Golgi/lysosome glycoprotein	Leishmania braziliensis
A4HNB5	R.SQFSIVFTNLATDTR.C R.GTTFHEPNTYR.V	201	21776,9	2	2	0,11	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4H7T6	K.TVSISGYGTAK.G K.EIVPEDSTFK.V	429	46059,3	7	16	0,24	ENOL protein (EC 4.2.1.11)	Leishmania braziliensis
A4H7P6	K.AAAAAAGVPLYQYIAR.L K.INQIGTISESIAAAK.- K.LGANAILGCSM(+15.994900)AISK.A K.YGQDAVNVGDEGGFAPPIK.H R.NVNEILAPALLGK.E K.AQIVGDDLTVTNVDR.V K.NPEPTYVSAK.Q	846	90974,5	4	5	0,06	Putative immunodominant antigen	Leishmania braziliensis
E9AI53	R.NAM(+15.994900)AIFNDDGQVAR.V K.LTGVAEPALQR.T K.LISEYSTSM(+15.994900)LEAK.L R.LHESPVHDLR.F	313	33845,9	5	7	0,22	DHODH protein (EC 1.3.3.1)	Leishmania braziliensis
A4HMQ9	R.LTAELLDVM(+15.994900)AK.K R.YLAAISEAYPHFPGVK.M R.YVFPTALANVNAFYR.R K.GFDFYLAYSAR.H R.YYTLPLGSINSM(+15.994900)GLPNK.G	484	53600,2	5	5	0,15	Putative aminopeptidase P	Leishmania braziliensis
A4H8J8	R.IESDVLVTEGTVNYTTVPR.T R.GYAADITCSFPVNGK.F K.GTNTDSGLEVLQAK.L R.TTCTHLIAAGILK.G K.VIYNAVLDHDK.V	331	37027	1	1	0,05	Transaldolase (EC 2.2.1.2)	Leishmania braziliensis

A4HCC8	K.ADCFVGEADPGVISVTK.I	814	85276,3	1	2	0,02	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HLW4	R.DALLALNSGLQASLGYTR.G	498	57150,4	10	13	0,26	Putative carboxypeptidase (EC 3.4.17.1)	Leishmania braziliensis
A4HQG6	R.FSFITAPEVK.D R.ITTNYVEETFVQSLYGVIEVGHGK.Y R.TGELDSILEK.Q R.LPEFFEAQPAFSQENM(+15.994900)R.K K.GSGELNTVQCANLR.E K.SATALSTEFVGR.K K.LDEVYASVK.S R.ELITQPVCNAR.S K.KLETIFTK.V R.ATGEVLNPEHLR.R	441	48420,2	9	19	0,3	Putative histidine secretory acid phosph	Leishmania braziliensis
A4HCN4	R.TIADNEPVPLR.C R.TQGTSPQNLAQTM(+15.994900)LANM(+15.994900)NAHR.L R.LDSTSDLK.A R.ADCVLNLYDVAAAFEASGR.L K.AAYPGLVEVNAAWYK.Y R.YNDPSLVESPLFPSTR.Y R.MVDYSRPTVEDGNCAM(+15.994900)TTTQYSNM(+15.994900)GCPR.T K.DAWIEGLCADPNAR.A R.GRYNDPSLVESPLFPSTR.Y	157	16428,4	7	10	0,46	Putative endoribonuclease L-PSP (Pb5)	Leishmania braziliensis
A4H716	K.M(+15.994900)VYISGQLPK.N K.MVYISGQLPK.N K.VFGEEVGR.H K.LM(+15.994900)VGQLGDPLTIEEGK.A K.LGITLPAPAAPAASYVAFNVVVGK.M K.AAAASCAVYLIAQMK.A K.AAAASCAVYLIAQM(+15.994900)K.A	503	57454,9	10	11	0,26	Putative carboxypeptidase	Leishmania braziliensis
	R.IFADEVVCYPLHVLLR.Y R.SSAFPEFLAPLLK.E K.TLLDEAEGVK.T K.AYLGLETEGR.D R.SLM(+15.994900)IHESQSR.F R.M(+15.994900)YSAQAALPNDFSM(+15.994900)LK.A K.NNDFATFVPTLK.E R.LSTTVPLIWAECR.K							

A4HLJ9	R.GAAIGELHGLIAELM(+15.994900)TAPSTK.T K.VWGFDFESGR.L	408	46642,8	6	7	0,2 MPK11 protein	Leishmania braziliensis
E9AIG9	R.YPNASVQALDLLR.R K.EIFDEVVLAK.R K.IVDLIGTPSDEDISSVGSAAAQK.Y R.ALHIIHSAGVIHR.D K.SLAELQAEVCR.L R.IIGAGSYGIVIR.A			7	10	0,36 Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1	Leishmania braziliensis
A4HLC5	R.RTYGETDEVVAQK.V K.VVLGQM(+15.994900)AAIAAK.L R.ILYGGSVSASNAK.T R.TYYGETDEVVAQK.V K.VATPEQAQEVHALLR.K K.VSDACLQGM(+15.994900)VIACIGETLQQR.E K.SGAFTGEVSM(+15.994900)PILK.D	244	26802,4	7	7	0,31 Proteasome subunit alpha type (EC 3.4	Leishmania braziliensis
A4HP03	K.LGSTSLGIR.T K.RVPSNLVISSSM(+15.994900)SK.I R.YDAQAIGGGAEAAQSVFTER.Y R.TPEGVVLAAEK.R R.VPSNLVISSSM(+15.994900)SK.I R.GVNTFSPEGR.I R.IFQIEYAVEAIK.L	209	22949,5	2	2	0,11 Putative translation elongation factor 1	Leishmania braziliensis
A4H9Q9	K.LVPVAFGVK.K K.AWDDAVDLEALAQK.L	313	34302	7	10	0,26 Nonspecific nucleoside hydrolasewith=	Leishmania braziliensis
A4HLA1	K.ILEFYTK.V R.YPRPEQCHTQVASK.L R.TAPQIHGETGLGTVSYPSEFK.T K.VHDPCAVAYVIDPTVMTTNR.V K.VHDPCAVAYVIDPTVM(+15.994900)TTNR.V K.SITLVPTGGLTNIAMAAR.L K.SITLVPTGGLTNIAM(+15.994900)AAR.L	126	14398	5	6	0,31 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	K.LDGQFCDSEGVS.R.L K.FEYLSNPDHWR.I R.LNNVLPASTTSTR.S R.IKLDGQFCDSEGVS.R.L						

A4H677	H.TCGTLQQDTVENYK.F R.GAGGAIPPNATLVFK.I K.SPNVSDPCSVMHYHGLTNGK.V	155	16645,4	2	7	0,23	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Leishmania braziliensis
A4HQH7	K.IDAAATAHPVNLSDNVK.A K.AGVVVVSDIFGMLANSK.R K.AGVVVVSDIFGM(+15.994900)LANSK.R K.ISNFDTFAPR.M R.YDPDAYTPEER.K K.VPVLVM(+15.994900)PSK.D	240	26123,7	6	8	0,27	Similarity to endo-1-like protein	Leishmania braziliensis
A4H6Z3	R.ISPLNSFNSQSDENPEALTR.Y R.IVAPSAVAITDHECPGAFAR.N R.ASM(+15.994900)GLIITEATQIEK.G R.ATVPSNVDEGVR.I R.GDFFSQACGADK.W R.NISFLDVM(+15.994900)R.G	382	41015,9	6	11	0,23	Putative NADH:flavin oxidoreductase/	Leishmania braziliensis
A4HKT8	K.YFSSGPIVCMVWEGK.N R.VLLGATNPADSQPGTIR.G R.NVCHGSDSVESAQR.E R.TFIAIKPDGVQR.G K.YFSSGPIVCM(+15.994900)VWEGK.N K.DLASKPFFEGLVK.Y R.GDYAVDVGR.N R.GLVGEIISR.F K.MLQPTTEQAQGHYK.D R.EVAFWFK.V	151	16660,4	10	21	0,73	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.	Leishmania braziliensis
A4HNE9	K.EAAM(+15.994900)IALAALQSAIGTAVK.A K.AVTYPGLLTISIR.C K.DAVLVVTQHQPDR.L R.LM(+15.994900)RPDSVTALYEVTPGIGCCM(+15.994900)TGR.A K.STEFDTLTQK.E R.AREEASDYHYR.Y	250	27218,8	6	8	0,36	Proteasome subunit alpha type (EC 3.4	Leishmania braziliensis
A4H879	K.HGEVCPANWK.K K.GGLGPM(+15.994900)EIPM(+15.994900)LADK.T K.KGGLGPM(+15.994900)EIPM(+15.994900)LADK.T R.AYGVLEKK.G	199	22539,3	12	23	0,36	Tryparedoxin peroxidase	Leishmania braziliensis

	R.KKGGGLGPM(+15.994900)EIPM(+15.994900)LADK.T K.GGLGPM EIPM(+15.994900)LADK.T R.GLFIIDPK.G R.AYGVLDDEK.K R.LLEALQFVEK.H K.INLASYK.G K.KINLASYK.G R.QIIVNDM(+15.994900)PVGR.N							
A4HBM3		471	51664,3	5	7	0,14	Hexokinase (EC 2.7.1.1)	Leishmania braziliensis
	R.GNAVTPINM(+15.994900)ECGNFDSK.Y R.M(+15.994900)LPSYVYTS DPAK.A R.LYQECITGILGPTSNAK.V K.DGSGVGAAM(+15.994900)ICALAANQK.- K.YALPTTVYDDEM(+15.994900)DAITPNR.D							
A4HNU9		249	27105,8	2	2	0,14	Eukaryotic translation initiation factor 1	Leishmania braziliensis
	R.TSIAENALVGSYAVATNK.G R.HGLIVPSITTDQELQHLR.N							
A4H3T9		522	52727,8	9	17	0,26	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	K.DSINTGSIVLISAGSNAIGIR.N R.CTQCATGYILTS DQR.C K.GLLASAGSTTVSGK.S R.NLAALFVLDAVATNGASVVR.V K.SNGLAVTTVVDR.Q K.GVALNTAEVYK.S K.AAVLAIDYGR.C R.VDAQSSFVSK.A R.CEECTGALVSINAPLVVDGSSM(+15.994900)FR.V							
A4HD42		155	16793,4	4	6	0,4	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	K.GVVPLIPVDNTVSGALNIR.N K.EKGVVPLIPVDNTVSGALNIR.N R.NSNLEM(+15.994900)IQACDAVIADLSPFR.S R.SKEPDCGTAFELGYAAALGK.V							
Q25225		403	45280,5	10	25	0,31	Probable eukaryotic initiation factor 4A	Leishmania braziliensis
	R.KGVAINFVTEK.D R.GGDIIAQAQSGTGK.T R.ELALQTAEVISR.I K.TGAFSIGLLQR.L R.VLVTTDLVAR.G K.FCETFVGGTR.V K.DIQVALFSATM(+15.994900)PEEVLELTK.K R.GIYSYGFEKPSSIQQR.A							

A4HN50	R.HNLIQGLVLSPTR.E R.ESLTLEGIK.Q	139	14943	3	3	0,26	Putative 60S ribosomal protein L23	Leishmania braziliensis
R4NHU5	R.VSVALPVGAVVNCADNTGAK.N K.NLYIISVK.G K.VLNAVIIR.Q	287	31527,5	2	2	0,1	Activated protein kinase c receptor (Fr	Leishmania braziliensis
A4HCV5	R.INVESAINQIAFSPNR.F K.DVLAVAFSPDDR.L	512	54366,7	7	7	0,14	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A0A068CAM7	K.DTYPGLQAYSDFPTEVR.F K.TVTSDELEHIAGLQVLCR.V R.LAVSASIESAIEK.R R.SFVNHVSVISAK.T K.STLPEFNMY(+15.994900)STLK.D A.TVQDAPGTLATTR.V A.AVVQPIPLATVQDAPGTLATTR.V	76	8053,1	2	2	0,37	Cytochrome C (Fragment)	Leishmania braziliensis
A4HCL7	R.KSGTIEGFAYSK.A K.GGSNGVGNLFGIVNRK.S	226	25353,8	3	3	0,17	Peroxidoxin (EC 1.11.1.-)	Leishmania braziliensis
A4HGY1	R.HSTINDLPVGR.N R.DYGVLIASAGIALR.G R.TATVRDPAPQFSGK.A	654	71213,8	11	33	0,22	Putative heat-shock protein hsp70	Leishmania braziliensis
Q2HZY7	R.IINEPTAAAIAYGLDK.R R.TTPSYVAFTDSER.L K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G K.VQSLVSDFFGGK.E K.DAGTIAGLEVLR.I K.NGLENYAYSM(+15.994900)K.N R.SVHDVVLVGGSTR.I K.ELESTCNPIM(+15.994900)TK.M K.NQVAM(+15.994900)NPHNTVFDAK.R R.NHITITNDK.G K.IFTPEEISSM(+15.994900)VLLK.M	845	94187,6	4	10	0,07	Elongation factor 2	Leishmania braziliensis
	R.ETVTDVSSQQLSK.S R.VFYACCLTASPR.L R.GVIIGEENRPGTPIYNVR.A K.SLANATTLAIR.T							

A4H532	R.TADCLGGVAGGGATPIVDGR.A R.AYVVPFVVTM(+15.994900)SGGPGGASAGR.A	2392	246287,8	2	2	0,02	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HCZ3	K.KPETAINVEVTK.D R.VVQVNPITGVK.D R.ILTSNCGANVIR.V R.ILLLDCCPLEYK.K K.GASDLAAHFLYK.A	551	60278,3	5	6	0,11	T-complex protein 1 subunit gamma	Leishmania braziliensis
A4HJV3	R.FVEFFAAPSFSFGAVAR.E R.LEGEYLSVSK.F	1083	119539,6	2	2	0,02	SCG5 protein	Leishmania braziliensis
A4HLC8	R.EIVSCQAGQCGNQIGSK.F R.M(+15.994900)NVYFDESAGGR.Y R.IM(+15.994900)M(+15.994900)TFSVIPSPR.V -M(+15.994900)REIVSCQAGQCGNQIGSK.F R.LAVNLVPPFR.L R.AVLM(+15.994900)DLEPGTM(+15.994900)DSVR.A K.EVDEQM(+15.994900)LNVQNK.N R.GLSVAELTQQM(+15.994900)FDAK.N R.VGEQFTGM(+15.994900)FR.R R.FPGQLNSDLRK.L	443	49693,6	10	24	0,24	Beta-tubulin	Leishmania braziliensis
A4H727	R.LIGQVVSSLTASLR.F R.AVCM(+15.994900)IANSTAIAEVFAR.I R.SLFLDLEPTVVDEV.R.T K.YM(+15.994900)SCCLM(+15.994900)YR.G K.DVNAAIATIK.T	451	49633,4	5	16	0,14	Alpha tubulin	Leishmania braziliensis
A4HEN9	K.EGAAVVDVGTTPVTDPSK.K	299	31625,7	1	1	0,06	Putative C-1-tetrahydrofolate synthase	Leishmania braziliensis
A4HKL7	K.NDSSTVVAPVPTVSVSK.Y K.VTFTTADETGR.A	187	20510,2	2	2	0,16	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HPQ9	K.GTLPISAINVNDVSVTK.S K.TCCVCGYGDVGK.G K.AGVFFLPK.A	437	47778,2	3	8	0,08	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	Leishmania braziliensis
A4H497	R.EAYPGDVFYLSR.L K.TSIAVSTIINQVR.S	574	62558	2	6	0,05	ATP synthase subunit alpha	Leishmania braziliensis

A4H4H8	R.VIPNFM(+15.994900)IQGGDFTNFDGTGGK.S R.IIIGLFGK.D	187	20194,4	2	2	0,16 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC	Leishmania braziliensis
A0A088RLE0	K.IVDSNDSLRLR.H R.NIILGLNLASLAK.V R.DM(+15.994900)QVFGDTVIAISK.E	342	37657,9	3	6	0,11 Proliferating cell nuclear antigen	Leishmania panamensis
A4H500	K.APLAVVTGLQEVR.A	264	29815,4	1	1	0,05 Putative 60S ribosomal protein L7a	Leishmania braziliensis
A4HHC6	R.GSATDITLPTLAGK.T R.GFTPQLVEFYK.T	148	16864,3	2	2	0,17 TXN2 protein	Leishmania braziliensis
A4H4C5	R.IHSSGTLVTM(+15.994900)EGPQFSTK.A K.AQLYPPEIHK.A R.IQPLVAAK.Y K.ALAESPFEDPAHHALK.D	306	33145,7	4	5	0,17 Putative methylthioadenosine phosphoc	Leishmania braziliensis
A4HPI7	K.ATDVANSSLAPTHPIR.L	258	29653,1	1	2	0,06 14-3-3 protein-like protein	Leishmania braziliensis
A4HPP4	K.FPTVCSPSESLTEK.V K.ISPQALSEAIQAVLK.V	214	24563	2	4	0,14 Putative 60S ribosomal protein L10a	Leishmania braziliensis
A4HGD9	K.DLCAEIQQQTVR.L K.LVTHATVTEAASQGM(+15.994900)R.V	126	14347	2	2	0,22 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HF12	K.TPETAQVFVDELIPK.V	607	68606,3	1	2	0,02 Putative thimet oligopeptidase (EC 3.4.	Leishmania braziliensis
A4HP20	K.ALASATSEGVELNVK.N K.DTPFTIFEEESAR.R K.GKDFVLAALK.R	265	29706,7	3	4	0,15 Proteasome subunit alpha type (EC 3.4	Leishmania braziliensis
A4HAA2	K.TVLVEGAGSQPVK.G	432	47778,9	1	2	0,03 Peptidylprolyl isomerase-like protein (E	Leishmania braziliensis
A4HC34	K.EGFDGQM(+15.994900)TPENTQVGR.V K.ASSTLVDASSIQK.V R.LM(+15.994900)YKEPIPIQLVR.K K.KASSTLVDASSIQK.V	231	25114,6	4	7	0,19 Proteasome subunit alpha type (EC 3.4	Leishmania braziliensis
A4H7N9	K.YENAQPTYSGNTVVK.C K.ISFEANPIPK.A	115	13029,2	5	7	0,46 Putative calpain-like cysteine peptidase	Leishmania braziliensis

	R.VEPIGNTTMQR.D K.DNGNGLLFR.I R.IVNDEEHK.W								
A4HNL2		255	28720,2	1	1	0,07	Stress-inducible protein ST11 homolog	Leishmania braziliensis	
A4HBP1	K.AIEHNPDEASGALYSNR.A	423	48127,6	2	2	0,06	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis	
A4HII0	K.AELVSQGFSEPK.D R.RESGPTAAIIM(+15.994900)LR.V	658	71348,2	3	3	0,07	Putative heat shock 70-related protein	Leishmania braziliensis	
A4HEU3	K.SQTFSTAADNQTQVGIK.V R.NNAETQLTTAER.Q K.TQNTITAHGGLSK.E	149	16666	3	3	0,24	Putative 40S ribosomal protein S16	Leishmania braziliensis	
Q29U49	K.VNGVPLQQILPDTLR.A K.TAIAVATVTK.A K.IM(+15.994900)EAVTVVGSK.C	696	79890,2	4	10	0,08	Heat shock protein	Leishmania braziliensis	
A4HMX7	K.TLTVEDNGIGM(+15.994900)TK.A K.GVVDEDLPLNISR.E R.ELISNASDACDKIR.Y K.ADLVNNLGTIAR.S	860	94316,6	1	1	0,02	Putative ATP-dependent RNA helicase	Leishmania braziliensis	
A4H6M2	K.VTPILVATDVASR.G	190	21267,2	2	2	0,16	40S ribosomal protein S5	Leishmania braziliensis	
A4HCJ1	R.DHISTTAAYVPHTSGR.W K.SM(+15.994900)PECLADEIVNASK.G	175	20039,8	1	1	0,07	Putative 40S ribosomal protein L14	Leishmania braziliensis	
A4HEM2	R.VGVIVDIVDANR.V	240	27413,8	1	1	0,07	Putative 60S ribosomal protein L7	Leishmania braziliensis	
A4H8V4	R.AVEPYIAYGYPSLATVR.A	449	49022,4	5	11	0,18	Elongation factor 1-alpha	Leishmania braziliensis	
A4HIY0	K.VHM(+15.994900)NLVVVGHVDAGK.S K.SVFTIIDAPGHR.D R.VETGIM(+15.994900)KPGDVVTFAPANVTTEVK.S K.IGGIGTVPVGR.V K.M(+15.994900)VPQKPM(+15.994900)CVEVFNDYPPPLGR.F	595	69200,2	1	2	0,02	Paraflagellar rod protein 1D	Leishmania braziliensis	
A4HAC0	R.SQLDATQLAQVPTR.T	317	33271,5	1	1	0,05	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	Leishmania braziliensis	
A4H3J2	K.AVQNTDLVLIPAGVPR.K	560	61822	4	4	0,09	Putative delta-1-pyrroline-5-carboxylat	Leishmania braziliensis	

	R.LSGSNDKPGAGQFVTR.F R.NFM(+15.994900)GAVIDEASFQK.N K.EVCELVDSTTK.Y R.YAAGNYVNDK.C							
A4HGEO		144	15637,1	1	1	0,09	40S ribosomal protein S14	Leishmania braziliensis
	R.IEDVTPIPTDSTR.R							
A4HPP5		103	11638,9	1	1	0,16	Nascent polypeptide-associated compl	Leishmania braziliensis
	R.LGVTPFSDIDEAVFYR.Q							
A4H6Y8		912	96369,6	1	1	0,01	Putative surface antigen protein	Leishmania braziliensis
	K.SLEQVYLQGTR.V							
A4HP24		135	14519,5	1	1	0,1	Putative poly-zinc finger protein 2	Leishmania braziliensis
	R.ECTSAADSAPCFR.C							
A4HNN1		116	12526,3	1	1	0,15	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Leishmania braziliensis
	K.AGQTITVHCTGYLAEGK.K							
A4H6R7		283	30261,9	2	2	0,08	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.11.1)	Leishmania braziliensis
	R.SGSAADTQALAER.V K.SECVAFCQR.A							
A4HP29		302	33459,4	4	4	0,15	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.11.1)	Leishmania braziliensis
	R.FDGGIIVAVDSR.A R.ASTGQYIASQTVLK.V K.ILANITYAYR.N R.SIFHATYR.D							
A4H7B9		837	91251,1	2	3	0,03	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	R.M(+15.994900)AGPALCSTTSVGK.V K.ELLVVTAQGNR.E							
A4H7I4		142	15532,9	3	3	0,21	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	R.AFAFM(+15.994900)DINPLSR.G R.GHVLVIPK.Q K.IITGEIPCAK.V							
A4HK76		934	102699,7	2	2	0,02	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	K.VLSPTLLIISVK.E K.IQNATLPLSTR.I							
A4HHN3		184	20949,6	2	2	0,11	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	R.AVTDFQVVTR.I K.FTDDLNVNDQK.C							
A4H868		219	24437,9	2	4	0,09	Putative 40S ribosomal protein S3	Leishmania braziliensis
	R.GLSAM(+15.994900)AQVESLR.F K.LLSNLQVR.R							
A4HJP8		422	48424,2	1	1	0,03	Putative calreticulin	Leishmania braziliensis
	K.VELSAGALHVDAAK.E							
A4H9T4		308	34842,8	4	4	0,17	Putative proteasome alpha 7 subunit	Leishmania braziliensis

	R.YLTEEELQR.F R.NIELLVLQHR.D R.AITVSPDGHLFQVEYAQEAVK.K K.GLAAVGVLGR.D						
A4HI56		1021	114513,5	1	1	0,01 Putative ubiquitin conjugation factor E	Leishmania braziliensis
	R.VTTVTGGDLGTVQR.N						
A4HBW6		143	15889,7	2	2	0,16 Putative 40S ribosomal protein S23	Leishmania braziliensis
	K.VSSVGLYALYR.Q R.SGHAVGDIPGVR.F						
A4HJR7		178	20143,4	1	1	0,06 Putative ADP-ribosylation factor	Leishmania braziliensis
	R.NATLLVFANK.Q						
E9AII6		131	14863,3	2	2	0,14 Contig, possible fusion of chromosome	Leishmania braziliensis
	K.M(+15.994900)DALPLSEEYR.Q K.DNGLLFR.I						
C6KJD9		376	42142,8	1	1	0,05 Actin	Leishmania braziliensis
	R.VNPEQHNVLLEAPM(+15.994900)NPK.Q						
A4H7F8		272	28736,5	2	2	0,13 Pyrroline-5-carboxylate reductase (EC 1	Leishmania braziliensis
	R.GQSYEM(+15.994900)AAQAVLGAAM K.IGFLGCGNM(+15.994900)GECIM(+15.994900)AGLLK.A						
A4H9F9		896	97404,5	2	5	0,03 Aconitate hydratase (Aconitase) (EC 4.2	Leishmania braziliensis
	R.SNLVGM(+15.994900)GVIPLQFK.D K.AVIAESFER.I						
A4HK26		280	31842	3	3	0,12 Putative prostaglandin f synthase (EC 1	Leishmania braziliensis
	R.HIDTAHFYR.N K.NIALTAWRPLGK.G R.IGFNPESFFPTER.N						
Q9XYY6		192	20957,5	1	1	0,1 L6 ribosomal protein	Leishmania braziliensis
	K.VDISSVDTSSITPEVFLRPK.A						
A4H5P8		230	25931	1	1	0,09 Putative prefoldin subunit 2	Leishmania braziliensis
	K.LNRPGANQAVTASQSTEANR.G						
A4HI65		614	67120,2	2	2	0,04 Putative RNA-binding protein	Leishmania braziliensis
	R.LQSLGTYNSCGAR.G R.AVHIFNVVAK.R						
A4H7H4		352	39078,3	2	2	0,07 IG-NH protein	Leishmania braziliensis
	K.THAALAITELLR.A K.DGFGDADFPPSTR.V						
A4HQ28		246	27490	2	4	0,1 40S ribosomal protein SA	Leishmania braziliensis
	R.FIPGTFTNQIK.K K.FSQHVGTSFHGGR.F						
A4H5R9		149	16795,8	2	2	0,17 Putative calmodulin	Leishmania braziliensis
	R.VFDKDGNGFISAAELR.H						

A4HMP2	R.HVM(+15.994900)TNLGEK.L	275	30245,9	2	2	0,08	Putative RNA-binding protein	Leishmania braziliensis
A4HMK9	R.YTDLIADR.T R.KFDDGPRPPLVQR.D	305	33939,2	3	3	0,11	Putative 60S ribosomal protein L5	Leishmania braziliensis
A4HDZ1	K.AILDVGLAR.T K.DIIAQIVQAK.I K.GAVDGGISVPHRPNR.F	168	18969,1	2	2	0,15	RNA-binding protein, putative, UPB2	Leishmania braziliensis
A4HBG6	R.YGPIETVK.I R.NLM(+15.994900)VNYIPTTVDEM(+15.994900)QLR.Q	280	33038,9	2	2	0,08	Contig, possible fusion of chromosome	Leishmania braziliensis
A4HJ14	R.ELGVVLFV.V K.AGDLVLPAGM(+15.994900)YHR.A	783	89149,8	1	1	0,02	Putative calpain-like cysteine peptidase	Leishmania braziliensis
E9JUG6	K.EKLDATSNSLVEKPDR.Q	483	52368,4	12	14	0,38	Trypanothione reductase (Fragment)	Leishmania braziliensis
A4H4D9	K.KYDVVAVYESSFTPLM(+15.994900)HNISGSK.H K.EHGPPCFAALGGTCVNVGCVPK.K K.VACAVFSIPPITCGLTEEEAAK.K K.NGAVVVDAYS.K.T K.TSVDNIYAIGDVTDR.L K.ISDFHSTIGVHPTSAEELCSM(+15.994900)R.T K.KLM(+15.994900)VTGAQYM(+15.994900)DLIR.E K.LM(+15.994900)VTGAQYM(+15.994900)DLIR.E R.LMLTPVAINEGSFAFVETLFGCKPR.A R.TPAYFYEK.G K.YDVVAVYESSFTPLM(+15.994900)HNISGSK.H K.SYTG(+15.994900)FDSTEGLSFHM(+15.994900)GFGALK.D	679	76020,6	10	10	0,19	Putative dipeptidyl-peptidase III (EC 3.4	Leishmania braziliensis
A4HKH0	R.EFAGSVEGVVDSFVTR.H K.LLLENSDGTFFNFDK.N R.AGLVGLFYTPEK.H R.EDAVVANDFLALK.R R.AEWEGFVAVVVK.E K.M(+15.994900)YGALVEQGEK.F R.FCILQALVR.A K.DVGPTVETNIGFIESYRDPGVR.A R.YYSPNITR.E K.TVPAVEFNDR.T	195	21631,3	3	6	0,19	Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	Leishmania braziliensis

	K.LNAAAESNSEVSSK.S K.VASAISEFGSFAR.F K.DQVTCHYEK.H							
A4HI52		191	21567,4	2	2	0,11	Putative p22 protein	Leishmania braziliensis
	K.SFEGEELVVR.Y R.KPGTCTFDLTK.S							
A4H6F2		253	29045,4	3	3	0,17	Putative 14-3-3 protein	Leishmania braziliensis
	R.YFAEVESGSDTQK.N K.ASEYTASLKPTSPIR.L K.TASLFSGFQQQVEK.E							
A4H7S2		153	16704,4	1	1	0,08	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	K.TFTSTDADLLFSK.V							
A4HIP3		338	36326,6	2	2	0,12	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	R.AALGPM(+15.994900)SAHLVSLR.N R.IGAVAPERPVPEPTSALAEQPEAAK.K							
A4HI30		180	18780,7	2	2	0,15	Putative 4-methyl-5(Beta-hydroxyethyl	Leishmania braziliensis
	R.GPGTAIFYGLAAVSVLK.S K.SPDLAEQLAK.A							
A4HAD7		491	56011,4	2	2	0,04	Contig, possible fusion of chromosome	Leishmania braziliensis
	K.VM(+15.994900)NYDAVYQCFK.D R.FTFDAEGK.V							
A4HK56		235	25289,7	4	4	0,27	Putative RNA binding protein	Leishmania braziliensis
	K.TSPKPDAHENSACVFVSPIFR.A R.YALVFFDNSAAVK.K K.NWGTGSVADATNVFSAAGK.V K.QQIM(+15.994900)ELFAGVK.V							
A4H9P0		821	91428,9	1	2	0,02	Putative heat shock protein	Leishmania braziliensis
	R.APSFTLNASETTAR.G							
A4HPQ5		356	38518,9	1	1	0,04	Eukaryotic translation initiation factor	Leishmania braziliensis
	K.LLGSYTTVGQVEGR.T							
A4HFD7		238	25440,6	1	2	0,06	Putative proteasome alpha 7 subunit (f	Leishmania braziliensis
	R.DIFSTPIHGAVLANR.V							
A4HFQ8		692	78299,5	2	2	0,04	Putative arginyl-tRNA synthetase (EC 6.	Leishmania braziliensis
	K.AFPLVPAQEPLITLGK.V R.VLVDFSSPNIK.E							
A4H7E8		138	16072,9	2	2	0,2	Ubiquitin-conjugating enzyme-like prot	Leishmania braziliensis
	K.VNLPCVDPDGTVNR.N K.ATGSNQNVSVGLR.D							
A4H3W7		188	21557,5	1	1	0,07	60S ribosomal protein L11 (L5, L16)	Leishmania braziliensis
	K.VLEQLCEQSPVLSR.A							
A4H3X8		300	33193,6	2	3	0,08	Putative spermidine synthase (EC 2.5.1	Leishmania braziliensis

	R.VLVIGGGDGGVVR.E K.SVDTDLTVPR.R								
A4HBQ1		336	36671,9	2	2	0,08	Putative la RNA binding protein	Leishmania braziliensis	
	R.EREDGVDAGAPSSAAPR.T K.VVAEALAGSDK.L								
A4HCQ7		408	44361,7	4	5	0,16	Aldose 1-epimerase-like protein (EC 5.1	Leishmania braziliensis	
	R.VCTTNPVIVVYTANALPADASGAK.G K.NCGPHNLHGGPVGFQNK.E R.VQLLSHGAAALNSVK.V R.EAALLYSPATK.L								
A4H9R6		118	13098,5	1	2	0,19	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis	
	R.LNETIPNSCSTTNTGNTPFALVR.K								
A4HPD9		152	16730,5	1	1	0,12	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase (EC 3.1.-	Leishmania braziliensis	
	R.VLSGSVTSEGEVVGSIQK.G								
A4HFB4		267	28566,8	2	2	0,1	6-phosphogluconolactonase (EC 3.1.1.1	Leishmania braziliensis	
	K.SVPVVLALSGGSTPK.R K.ICENLSQM(+15.994900)SFAAR.E								
A4HMA7		222	24023,3	7	8	0,4	Putative proteasome activator protein	Leishmania braziliensis	
	K.SAAPSVLM(+15.994900)ELQQIDADALLK.L K.SEDNLGVEVQM(+15.994900)AVLK.M R.EFQGELHDIYR.G K.LELSAM(+15.994900)QISTQIR.S K.LLGSFGDKDGGVPCVAGM(+15.994900)YATR.D K.VLADLEAR.A K.DGGVPCVAGM(+15.994900)YATR.D								
A4HK65		509	55860	3	3	0,07	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis	
	K.SNVIFVEGPR.D K.AASPDDALAIVTYM(+15.994900)HR.V R.VPYVGGQVSGK.L								
A4H7J0		285	32142,7	1	1	0,05	Proteasome subunit alpha type (EC 3.4	Leishmania braziliensis	
	K.VSASSADELLDPFK.H								
A4H673		124	13799,8	2	2	0,19	Putative nuclear transport factor 2	Leishmania braziliensis	
	R.FANLGFEEAFK.Q K.EQVQGVDAIMAR.F								
A4HAG0		2402	253219,5	1	1	0,01	Contig, possible fusion of chromosome	Leishmania braziliensis	
	R.TVDAAPGTPISDAGIDTR.F								
A4H5B4		117	12466,1	2	3	0,23	Putative small ubiquitin protein	Leishmania braziliensis	
	K.AEAAAASQAQISLK.V R.FLFDGAPIDESK.T								
A4HI39		146	16610,6	1	2	0,08	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis	
	R.AVLM(+15.994900)VVQATQSR.S								

A4HE05	K.VSIVATDIFTGNR.L R.LEDQAPSTHNVEVPVK.T	166	17796,7	2	2	0,18 Eukaryotic translation initiation factor ! Leishmania braziliensis	
A4H907	K.GAQPWAVQVEAR.A K.LLVEVTSEK.G	96	10539,2	2	2	0,22 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HDA9	R.LALDEPFTVR.V K.SDTQTIDSFLR.D	715	79932,6	2	2	0,03 Putative DNAJ domain protein	Leishmania braziliensis
A4HIW5	R.AGISVIQVDEPGLR.E K.LLADAVVTGSEAAVAEYSAPLR.A R.SNLLDAYQLLASLR.K R.AALHNM(+15.994900)VAAATELRR.I	770	85859,3	4	6	0,08 Putative 5-methyltetrahydropteroylrig	Leishmania braziliensis
A4HQJ7	K.LPASYGDLQRPLAFNK.V R.VEVAAGHGFGKPIK.T K.IDLPVGTVTSLFASYK.K K.VVNTFVGEYR.Y R.VTAM(+15.994900)LNYAR.T	697	78266,9	5	5	0,09 Putative prolyl oligopeptidase (EC 3.4.2	Leishmania braziliensis
A4H7H9	R.LSPPHIVYDEGK.M R.AQLSHVLAGEELESNGPRPK.V K.VVFGISTDADIAK.T K.NYAAVSNLSVM(+15.994900)SCPM(+15.994900)AFVIK.D	199	22173,1	4	5	0,23 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4H5Q8	K.ESAIQQAFVCK.H K.TDNNEILLNM(+15.994900)DM(+15.994900)ESGHFSAK.D K.YYDYM(+15.994900)LSYSPVDNVR.A R.VLVGHNEVDVFM(+15.994900)QTI AVR.A R.NTFSDFIAAAECLVDAK.M K.M(+15.994900)TTPSQLACEGR.S R.SAGLLVGTVLNM(+15.994900)RPDLFK.A	731	83024,8	7	7	0,15 OPB protein (EC 3.4.21.83)	Leishmania braziliensis
A4HJ18	R.ETVPTLEVGC PER.R K.LYVAATCPFCHR.V K.FPLLNELAEAGM(+15.994900)VTPEAK.A R.ASVLETLP TAEQCVENYR.H K.SLTPELTNGYDFFAK.F K.TM(+15.994900)NAGDVAILPFLVR.V K.HPFGE GPF FGGK.R	450	50314,2	8	11	0,25 TDR1 protein	Leishmania braziliensis

A4HP21	R.LATGDTVLVPR.G	115	12579,4	3	6	0,34	Putative universal minicircle sequence	Leishmania braziliensis
A4HEZ3	R.SCYNCGGTGHLR.D K.SCYNCGSTEHLR.E K.SCFNCGSTEHLR.E	194	22226,4	2	2	0,15	Prefoldin-like protein	Leishmania braziliensis
A4HHC7	K.GFTTNYGLTESIFCQAK.V K.VAFVENVAELVK.S	144	16276,1	5	6	0,31	TXN1 protein	Leishmania braziliensis
A4HFY0	R.HLVEGLTK.A R.GFTPLLIEFYEK.Y K.MPWLAIPFSQR.H K.M(+15.994900)PWLAIPFSQR.H K.QQSEVSVSSLSGK.T	401	44115,5	1	1	0,04	Putative branched-chain amino acid an	Leishmania braziliensis
A4H9X3	K.VGANYAGPLLQDEAK.A	380	42264,4	9	14	0,27	Putative aminopeptidase	Leishmania braziliensis
A4HFB9	K.VALDSNYSVK.M K.AQVWTLDIVM(+15.994900)SSGR.G K.APALESYTDDEM(+15.994900)LLATNK.L R.VITAAYNILNTALR.Q R.LLIDATKPGAK.V K.KIEPITGLKPQK.A R.YIIDGYR.C K.YATFPFAIR.N K.EGEVVAHFK.I	1068	119528,5	5	9	0,05	Polyubiquitin, putative	Leishmania braziliensis
A4H537	K.TIALEVEASDTIENVK.A K.TIALEVEPSDTIENVK.A R.TLSDYNIQK.E K.ESTLHLVLR.L R.LIFAGK.Q	376	42354,5	4	10	0,14	Splicing factor ptrs1-like protein	Leishmania braziliensis
A4HEA3	R.TVTLTELDYLK.S K.EVASIFIGM(+15.994900)GPAGR.N R.VVAALNNM(+15.994900)M(+15.994900)IGDVR.V R.SKIEAITSVTR.F	279	30140	4	5	0,35	Putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7- ϵ	Leishmania braziliensis
	R.YVFPQM(+15.994900)YFSPQLQAATDTLISTAK.K R.AGIQCALDSGADGVLPYVNNALQELQDAVSCCYPTTGTR.S K.GLLGYVPESNK.N							

A4HJ88	K.GIDIAFLGQNDLCM(+15.994900)SM(+15.994900)GLYDGR.Y	263	28569,5	2	2	0,13 Biotin/lipoate protein ligase-like protei	Leishmania braziliensis
A4HB57	K.M(+15.994900)TAGGQPFALVAAVQTAGR.G R.EATM(+15.994900)VNAIAEEFGVK.S	301	32771,1	1	1	0,06 Contig, possible fusion of chromosome	Leishmania braziliensis
A4HDD4	R.IYPGQSCAIVLQDLGAK.A	571	62694,3	1	1	0,03 Malic enzyme	Leishmania braziliensis
A4H4S0	R.IVVFGAGAAAVGVAK.N	281	29771,9	1	1	0,04 Putative deoxyribose-phosphate aldola	Leishmania braziliensis
A4H5U0	R.TGSASDSIDLAR.Y	242	26744,7	3	3	0,12 Mitochondrial RNA binding protein 2	Leishmania braziliensis
A4HM77	R.VVTVTLPVYAAR.F K.ASFLPNTAK.G R.FLGVLEER.M	264	30020,9	2	2	0,07 40S ribosomal protein S3a	Leishmania braziliensis
A4HIU2	R.NVLSDALVR.R R.FTVQEVQGR.N	162	18505,5	2	2	0,07 Putative mago nashi-like protein	Leishmania braziliensis
E9AIQ3	R.VSPAVLEEVKR.L K.LTSM(+15.994900)ADIPNSSETVGLVR.F	551	59588,1	2	2	0,05 T-complex protein 1 subunit delta	Leishmania braziliensis
A4HHN0	K.GETIISNDGATILSR.L K.IM(+15.994900)GVQAPPPSSLNR.E	267	28925,7	3	3	0,16 Enoyl-CoA hydratase/isomerase-like pr	Leishmania braziliensis
A4HDJ0	K.LATIPGLGGTQR.L R.TFSEGVQSNDFSALTR.M K.M(+15.994900)ANTIAYSQVAVK.L	170	19166,3	5	6	0,21 Putative IgE-dependent histamine-rele:	Leishmania braziliensis
A4HLW7	R.YTETSYDK.A R.VVDVVHNNR.Y K.ASYMHIR.S K.ASYM(+15.994900)AHIR.S K.AFQANAAAFVK.K	527	56186,2	3	3	0,09 Putative aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	Leishmania braziliensis
A4HPA0	R.HNCPSRPDQVSEIVK.H R.LVNAPTNLLDTVTFTEIAM(+15.994900)R.W R.GQEVSVATAIAR.S	411	44041,7	3	3	0,08 Glucokinase (EC 2.7.1.2)	Leishmania braziliensis
	K.NLPDHGASFLR.R K.YVQALAGYM(+15.994900)ASK.A R.VGFSQASQHDR.S						

A4HMZ0	K.VAEFLEAHPAVER.V R.SANPTVAVLEQR.L K.VGITDGFVR.V K.YVDGHDM(+15.994900)TVGGALVTNSK.D R.VVYSGLASHPQK.E R.LTQNILGNLM(+15.994900)SPQVAFLQLQTVK.T	410	44566,4	6	10	0,21	Putative cystathione gamma lyase (EC : Leishmania braziliensis	
A4H639	K.EFSVFSDAAR.C R.TYSVQVR.G R.IAVSTADLTDPDYHCTR.V K.VTGM(+15.994900)TGDVCGEFK.V	611	66089,7	4	5	0,08	GP63, leishmanolysin (EC 3.4.24.36)	Leishmania braziliensis
A4H638	R.TYSVQVR.G R.IAVSTADLTDPDYHCTR.V K.VTGM(+15.994900)TGDVCGEFK.V R.ASETSSDM(+15.994900)QAFNVFSDAAR.C K.VTGM(+15.994900)TGDVCGEFKVPEAHVAK.C R.EDVTYAGM(+15.994900)CANVK.C	589	62623,7	6	10	0,13	GP63, leishmanolysin (EC 3.4.24.36)	Leishmania braziliensis
A4HNR4	K.NQIAETLAIPAEQR.I	317	33467,5	1	1	0,05	Putative ubiquitin-like protein	Leishmania braziliensis

ID: código da proteína no UNIPROT; **PI:** peptídeos identificados; **NA:** número de aminoácidos; **MM:** massa molecular em daltons (Da); **NP:** número de peptídeos identificado; **NS:** número de espectros correspondentes aos peptídeos; **C:** cobertura.

8.4. Proteínas identificadas na secreção de *L. (V.) braziliensis* após 6 h de incubação sobre as matrizes de colágeno polimerizadas.

Anexo 5. Proteínas identificadas na secreção de *L. (V.) braziliensis* após 6 h de incubação sobre as matrizes de colágeno polimerizadas. As secreções dos promastigotas foram coletadas e separadas por SDS-PAGE. O gel foi dividido em 8 seções contendo diversas bandas que foram extraídas, descoradas, reduzidas, alquiladas e digeridas. Os peptídeos foram identificados por espectrometria de massas (LC-MS/MS) usando a base de dados Uniprot.

ID	PI	NA	MM (Da)	NP	NS	C	D	O
A4HE26	K.HVVFGQVLEGEVVK.A R.VIPEFM(+15.994900)CQGGDFTAGNGTGK.S K.GFGYSGCPFHR.V K.FNDESFAGK.A R.VTMELFADAVPK.T R.VTM(+15.994900)ELFADAVPK.T	177	18662,9	6	17	0,38	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	Leishmania braziliensis
A4H3U2	R.LCAECDAGYSLAADATSCR.N R.VAFCSTCATAAADTCIK.C R.LSDTCAVPNCK.K	466	48975,9	3	3	0,1	Surface antigen-like protein (Fragment)	Leishmania braziliensis
A4HMB3	K.M(+15.994900)VYGDAVELENLVAVQSLSGTGALSLGAK.L R.ANM(+15.994900)AALHETALLAQITINDAVR.S R.LVHLILNSSELR.K K.NIHTYTYDDPK.T R.SEYTCPPAHGAR.L K.TVSLNFEGM(+15.994900)K.K K.TPIYLSNPTWPNHNSIVK.G R.IVYDELLR.L R.RIVYDELLR.L	409	45631,2	9	12	0,3	Putative aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)	Leishmania braziliensis
A4HBM3	K.SALTGNSANLFDIAQSVK.K R.GNAVTPINM(+15.994900)ECGNFDSK.Y R.M(+15.994900)LPSYVYTSDBAK.A K.ATGVYYALDLGGTNFR.V K.DGSGVGAAM(+15.994900)ICALAANQK.- R.VNNLM(+15.994900)NHLAIR.D	471	51664,3	6	6	0,2	Hexokinase (EC 2.7.1.1)	Leishmania braziliensis
A4H7T3	R.GAALDVFEVEPLPK.D K.ADNDGIVLILGR.S K.LSGSVSAIVSGTDASR.F K.M(+15.994900)VIIGYGDIGQACGEK.A K.LLITPHCGNLTVIER.T K.KLSGSVSAIVSGTDASR.F	336	37119,7	6	8	0,23	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4H563		176	19624,5	3	3	0,19	Putative methionine-S-sulfoxide reductase (EC 1.8.4.11)	Leishmania braziliensis

	K.AFGGGPCVTTLEK.A K.TAAENYIAR.L R.SAIFYYNDEQK.T								
A4H4C5		306	33145,7	4	4	0,2	Putative methylthioadenosine phosphorylase		Leishmania braziliensis
	K.DAIM(+15.994900)TKPEHIPAEVK.Q R.IHSSGTLVTM(+15.994900)EGPQFSTK.A K.VDGVPCVFLPR.H K.QM(+15.994900)GGHLIGM(+15.994900)TTATEAR.L								
E9ALX3		994	104973,9	1	1	0,02	Uncharacterized protein		Leishmania mexicana
	R.TASM(+15.994900)AKNISGSAPSVAEPEK.L								
A4HIL9		115	13021,5	5	9	0,59	Uncharacterized protein		Leishmania braziliensis
	R.AM(+15.994900)ETQIPLATSTAVNPSK.D M.PNLCSVCTFNPPITLLGSTIR.E R.AM(+15.994900)ETQIPLATSTAVNPSKPAK.F R.M(+15.994900)ELHQHFCDLHK.S K.FIFLSNPDHWR.M								
A4H6I8		538	57206,2	11	12	0,3	Putative aminopeptidase (EC 3.4.11.-)		Leishmania braziliensis
	K.SVEVM(+15.994900)NTDAEGR.I K.HAGIYVSDAK.A R.EGYTEVTVTALPATASR.T K.M(+15.994900)DM(+15.994900)GGSAGVFCAFIIVVR.S R.SESAVEESAVSAYVQTCAR.F K.SVCAAELEAICTSVQLCQR.L R.APAGAEAAIANAVAR.A K.VSCVAAHVLLVVGALGQLR.D R.VAFTNESVQGK.S K.GYGGIYAVGK.C R.YRNPHAATCAK.N								
A4HBW5		190	21544,6	2	2	0,12	Putative 60S ribosomal protein L9		Leishmania braziliensis
	K.AHVLNM(+15.994900)ITGVTK.G K.IPIACLNTTK.A								
A4HJC7		673	70472,3	4	4	0,07	Uncharacterized protein		Leishmania braziliensis
	K.GYTLTAIGVCIK.R R.ASFALSAEER.R K.IDQIDIFNM(+15.994900)K.T K.LYGPFPPASWAQM(+15.994900)PSLER.L								
A0A088RI51		247	27824,7	2	2	0,08	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1)		Leishmania panamensis
	K.DSVQQESFALR.K R.LQLQLLK.Y								
A4HPP6		316	35812	2	2	0,08	Uncharacterized protein		Leishmania braziliensis
	K.EM(+15.994900)GEIPPPSEVR.T								

A4HFX7	R.DGTAYYFGNYTK.D	197	22082,9	2	2	0,13 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HNL2	K.LVFGISGDAPVPK.F R.AAQLSEEEAAVR.T	255	28720,2	2	2	0,13 Stress-inducible protein STI1 homolog	Leishmania braziliensis
A4H402	K.AIEHNPDEASGALYSNR.A K.ALQLSPGNEEVM(+15.994900)DK.L	148	17011,7	1	1	0,11 Putative ubiquitin-conjugating enzyme e2 (EC 6.3.2.19)	Leishmania braziliensis
A4HAX5	R.ECPPGITATPTNENPR.Y	198	21994,1	2	5	0,11 Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	Leishmania braziliensis
A4HD32	R.KVSTILITLSR.N R.NQNPENVVVER.K	245	27010,6	5	5	0,23 Putative alanine racemase (EC 5.1.1.1)	Leishmania braziliensis
E9AI53	R.YDIASEPTAEALALNYK.A K.AVCDTVAQESGMR.R K.YIVGECPLLQLK.G K.SGTEPGEATVALAK.Y K.AVCDTVAQESGNRR.V	313	33845,9	3	3	0,14 DHODH protein (EC 1.3.3.1)	Leishmania braziliensis
A4HMQ9	R.YLAAISEAYPHFPGVK.M K.GFDFYLAYSAR.H R.YYTLPLGSINSM(+15.994900)GLPNK.G	484	53600,2	4	5	0,13 Putative aminopeptidase P	Leishmania braziliensis
A4H7T6	K.GTNTDSGLEVLQAK.L K.VIYNAVLDADHK.V R.IESDVLVTEDGVVNYTTVPR.T R.GYAADITCSFPVNGK.F	429	46059,3	3	5	0,1 ENOL protein (EC 4.2.1.11)	Leishmania braziliensis
A4HFH6	K.INQIGTISESIAAAK.- R.NVNEILAPALLGK.E K.AAAAAAGVPLYQYIAR.L	6164	700627,1	1	1	0 Putative calpain-like cysteine peptidase	Leishmania braziliensis
A4HNB5	R.SYLNPEPQNVPIADIPLNR.D	201	21776,9	2	2	0,11 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HCC8	K.TVSISGYGTAK.G K.EIVPEDSTFK.V	814	85276,3	1	2	0,02 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HLC5	R.DALLALNSGLQASLGYTR.G R.GVNTFSPEGR.I K.RVPSNLVISSSM(+15.994900)SK.I	244	26802,4	6	6	0,27 Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	Leishmania braziliensis

A4H9Q9	R.YDAQAIGGGAEAAQSVFTER.Y R.TPEGVVLAAEK.R R.VPSNLVISSSM(+15.994900)SK.I R.IFQIEYAVEAIK.L	313	34302	5	6	0,32 Nonspecific nucleoside hydrolasewith=GeneDB:LmjF18.1580	Leishmania braziliensis
A4H716	K.SITLVPTGGLTNIAM(+15.994900)AAR.L R.YPRPEQCHTQVASK.L R.NAQLVADVAGIVGVPIAAGCCKPLVR.K K.VHDPCAVAYVIDPTVM(+15.994900)TTNR.V R.TAPQIHGETGLGTVSYPSEFK.T	503	57454,9	9	9	0,25 Putative carboxypeptidase	Leishmania braziliensis
A4HQG6	R.M(+15.994900)YSAQAALPNDFSM(+15.994900)LK.A R.ITTNVDLEDFTK.A R.LSTTVPLIWAECR.K K.TLLDEAEGVK.T K.ALFATIHETGHSK.Y K.NNDFATFVPTLK.E R.IFADEVICYPLHVLLR.Y R.SSAFPEFLAPLLK.E R.GAAIGELHGLIAELM(+15.994900)TAPSTK.T	441	48420,2	11	17	0,37 Putative histidine secretory acid phosphatase	Leishmania braziliensis
A4HLW4	R.TQGTPSQNLAQTM(+15.994900)LANM(+15.994900)NAHR.L R.LDSTSCLK.A C.VLNLYDVAAAFEASGR.L R.ADCVLNLYDVAAAFEASGR.L K.AAYPGLVEVNAAWYK.Y R.YNDPSLVESPLFPSTR.Y K.DAWIEGLCADPNAR.A R.SWLDSPALSATLNPVVDAHLTWDAIQAAAK.D R.TIADNEPVPLR.C R.MVDYSRPTVEDGNCAM(+15.994900)TTTQYSNM(+15.994900)GCPR.T R.GRYNDPSLVESPLFPSTR.Y	498	57150,4	6	7	0,16 Putative carboxypeptidase (EC 3.4.17.19)	Leishmania braziliensis
A4HI39	R.GEAM(+15.994900)AVLGELR.F K.SATALSTEFVGR.K R.ELITQPVCNAR.S R.ITTNVVEETFVQSLSYGVIEVGHGK.Y R.ATGEVLNPEHLR.R R.FSFITAPEVK.D	146	16610,6	2	3	0,17 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	K.LKPEHVYQGVGR.A						

A4HCN4	R.AVLM(+15.994900)VVQATQSR.S K.MVVISGQLPK.N K.LGITLPAPAAPAASYVAFNVVVGK.M K.AAAASCAVYLIAQMK.A K.LM(+15.994900)VGQLGDPLTIEEGK.A K.AAAASCAVYLIAQM(+15.994900)K.A K.M(+15.994900)VVISGQLPK.N	157	16428,4	6	8	0,41 Putative endoribonuclease L-PSP (Pb5)	Leishmania braziliensis
A0A088SHU9	K.FDGTDLATVTALR.I	470	48522	1	1	0,03	Leishmania panamensis
A4HLA1	K.LDGQFCDSEGVSR.L R.NLIVNM(+15.994900)FFNSPEIQILGPVQENTIER.L K.FEYLSNPDHWR.I R.IKLDGQFCDSEGVSR.L R.LNNVLPASTTSTR.S	126	14398	5	6	0,52 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A0A088RTT3	K.GVVPLIPVDNTVSGALNIR.N R.NSNLEM(+15.994900)IQACDAVIADLSPFR.S R.SKEPDCGTAFELGYAAALGK.V K.EKGVVPLIPVDNTVSGALNIR.N K.EPDCGTAFELGYAAALGK.V K.KIYIAGPAVFHLDHGDAYYTK.V	155	16793,4	6	7	0,4 Nucleoside 2-deoxyribosyltransferase, putative	Leishmania panamensis
A4I5S5	K.SQTFSTAADNQTQVGIK.V R.NNAETQLTTAER.Q	660	71614,4	2	2	0,04 Putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial	Leishmania infantum
A0A088RJK2	K.DSINTGSIVLISAGSNAIGIR.N K.GLLASAGSTTVSGK.S K.AAVLAIDYGR.C	522	52640,8	3	6	0,09 Uncharacterized protein	Leishmania panamensis
A4H3T8	K.GLTVQSSGDDLASSAR.L K.GLLASAGSTTVSGK.S K.AAVLAIDYGR.C	572	58693,7	3	7	0,07 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HKT8	K.YFSSGPVCMVWEGK.N K.DLASKPFFEGLVK.Y R.VLLGATNPADSQPGTIR.G K.YFSSGPVCM(+15.994900)VWEGK.N R.NVCHGSDSVESAQR.E R.TFIAIKPDGVQR.G	151	16660,4	10	18	0,73 Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	Leishmania braziliensis

E9B376	R.GDYAVDVGR.N K.M(+15.994900)LQPTTEQAQGHYK.D R.GLVGEIISR.F R.EVAFWFK.V	151	16645,3	3	3	0,19 Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	Leishmania mexicana
A4HNE9	K.M(+15.994900)LQPTTEQAEGHYK.D K.YFSSGPVCMVWEGK.N K.YFSSGPVCM(+15.994900)VWEGK.N	250	27218,8	4	4	0,22 Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	Leishmania braziliensis
A4HGN7	K.EAAM(+15.994900)IALAALQSAIGTAVK.A K.AVTYPGLLTISIR.C K.STEFDLTQK.E R.YGVPIPIAVLAK.R	225	25592,8	3	3	0,16 Probable methylthioribulose-1-phosphate dehydratase (MTRu	Leishmania braziliensis
E9AIG9	K.M(+15.994900)SECTPLFFNAYR.M K.M(+15.994900)GDNYYVAPSGVQK.E R.YPESCAVLVR.R	251	27065,2	4	4	0,21 Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	Leishmania braziliensis
E9AUS1	R.ILYGGSVSASNAK.T K.SGAFTGEVSM(+15.994900)PILK.D R.TYYGETDEVVAQK.V K.VVLGQM(+15.994900)AAIAAK.L	131	14978,3	3	3	0,15 Putative calpain-like cysteine peptidase	Leishmania mexicana
A4HCL7	K.SKM(+15.994900)DALPLSEEYR.Q K.M(+15.994900)DALPLSEEYR.Q K.DNGLLFR.I	226	25353,8	2	2	0,11 Peroxidoxin (EC 1.11.1.-)	Leishmania braziliensis
A0A088RRM4	R.HSTINDLPVGR.N R.TATVRDPAPQFSGK.A K.DTYPGLQAYSDFPTEVR.F R.LAVSASIESAIEK.R K.STLPEFNMYM(+15.994900)STLK.D K.AM(+15.994900)AQIDFTTAVK.S K.TVTSDELEHIAGLVLCR.V	512	54398,8	5	5	0,14 Uncharacterized protein	Leishmania panamensis
E9AFK3	R.VSVALPVGAVVNCADNTGAK.N	139	14929	1	1	0,14 Putative 60S ribosomal protein L23	Leishmania major
A4HPQ8	K.TCCVCGYDVGK.G K.GTLPISAINVNDVTK.S K.AGVFFLPK.A	437	47808,2	3	6	0,08 Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	Leishmania braziliensis

A0A088RTF1	K.TPETAQVFDLIPK.V	607	68738,3	1	1	0,02 Thimet oligopeptidase, putative (EC 3.4.24.15)	Leishmania panamensis
A4HQH7	K.AGVVVVSDIFGM(+15.994900)LANSK.R K.IDAAATAHPVNLTSNDVK.A K.ISNFDTFAPR.M R.M(+15.994900)ENAIALLR.Q K.VPVLVM(+15.994900)PSK.D	240	26123,7	5	6	0,26 Similarity to endo-1-like protein	Leishmania braziliensis
A0A088S3N5	R.GLLVDFFNK.S K.AGVVVVSDIFGM(+15.994900)LANSK.R K.IDAAATAHPVNLTSNDVK.A R.M(+15.994900)ENAIALLR.Q K.VPVLVM(+15.994900)PSK.D	240	26210,8	5	6	0,26 Dienelactone hydrolase, putative	Leishmania panamensis
Q2HZY7	R.VFYACCLTASPR.L R.AYLPVAESFGFTADLR.A K.SLANATTLAIR.T	845	94187,6	3	5	0,05 Elongation factor 2	Leishmania braziliensis
A4HC93	R.ILAAM(+15.994900)SNAASQYLTGSER.A	424	45117	1	1	0,04	Leishmania braziliensis
A4I5Z0	R.AALGPM(+15.994900)SAHLVSLR.N	332	35565,1	1	1	0,04 Uncharacterized protein	Leishmania infantum
E9BUA4	R.LGVTPFSDIDEAVFYR.Q	103	11610,8	1	1	0,16 Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	Leishmania donovani
Q4Q1R5	K.DTPFTIFEEESAR.R	263	29563,6	1	1	0,05 Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	Leishmania major
A0A088RNK9	K.GGLGPM(+15.994900)EIPM(+15.994900)LADK.T R.AYGVLEKK.G R.LLEAFQFVEK.H R.GLFIIDPK.G R.AYGVLEK.K R.QITINDM(+15.994900)PVGR.N K.KGGLGPM(+15.994900)EIPM(+15.994900)LADK.T	199	22442,3	7	12	0,27 Tryparedoxin peroxidase (EC 1.11.1.15)	Leishmania panamensis
A4H879	R.LLEALQFVEK.H K.KINLASYK.G R.QIIVNDM(+15.994900)PVGR.N K.INLASYK.G K.GGLGPM(+15.994900)EIPM(+15.994900)LADK.T R.AYGVLEKK.G	199	22539,3	9	15	0,31 Tryparedoxin peroxidase	Leishmania braziliensis

A4HU13	R.GLFIIDPK.G R.AYGVLDEK.K K.KGGLGPM(+15.994900)EIPM(+15.994900)LADK.T	149	16795,8	4	4	0,3 Putative calmodulin	Leishmania infantum
A4HJV3	R.VFDKDGNGFISAAELR.H K.EAFSLFDKDGDTITTK.E K.DGNGFISAAELR.H K.LTDEEVDEM(+15.994900)IR.E	1083	119539,6	1	1	0,02 SCG5 protein	Leishmania braziliensis
A4HSH2	R.FVEFFAAPSFSPGAVAR.E R.EAYPGDVFYLHSR.L	574	62491	1	4	0,02 ATP synthase subunit alpha	Leishmania infantum
A0A088SK40	K.AGQTITVHCTGYLAEGK.K	109	11799,9	1	1	0,16 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Leishmania panamensis
A0A088RKI3	R.LIGQVVSSLTASLR.F R.SLFLDLEPTVVDEVR.T K.DVNAAIATIK.T	451	49633,4	3	6	0,09 Alpha tubulin	Leishmania panamensis
DOVTR0	R.IM(+15.994900)M(+15.994900)TFSVIPSPR.V R.LAVNLVPFPR.L R.LHFFM(+15.994900)M(+15.994900)GFAPLTSR.G R.FPGQLNSDLRK.L R.VGEQFTGM(+15.994900)FR.R	353	39285,1	5	10	0,16 Beta tubulin (Fragment)	Leishmania donovani
A0A088RKP5	R.SENTFICNR.T R.GQSYEM(+15.994900)AAQAVLGAAC.M	272	28643,4	2	2	0,09 Pyrroline-5-carboxylate reductase (EC 1.5.1.2)	Leishmania panamensis
A4HP29	R.ASTGQYIASQTVLK.V K.ILANITYAYR.N R.FDGGIIVAVDSR.A R.SIFHATYR.D	302	33459,4	4	4	0,15 Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1)	Leishmania braziliensis
A0A088RSS0	K.ASSTLVDASSIQK.V K.EGFDGQM(+15.994900)TPENTQVGR.V	231	25114,6	2	2	0,13 Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	Leishmania panamensis
Q25293	R.ELISNASDACDKIR.Y K.GVVDEDLPLNISR.E K.TLTVEDNGIGM(+15.994900)TK.A	701	80610,2	3	7	0,04 Heat shock protein 83-1 (HSP 83)	Leishmania infantum
E9BQY7	R.ISISVLGPDNTVGDIA.A	80	8632,5	1	1	0,2 Ubiquitin-like protein	Leishmania donovani

A0A088RYR1	K.VTFTTADETGR.A K.NDSSTVVAPVVPTVSVSK.Y	187	20482,1	2	2	0,16 Heat shock protein Hsp20, putative	Leishmania panamensis
E9ARD5	K.VHM(+15.994900)NLVVVGHVDAGK.S K.IGGIGTVPVGR.V K.SVFTIIDAPGHR.D R.VETGIM(+15.994900)KPGDVVTFAPANVTTEVK.S	411	45203,1	4	8	0,15 Elongation factor 1-alpha (Fragment)	Leishmania mexicana
A4HMW8	K.HGEAYGHIAIGVEDVK.A	141	16179,9	1	1	0,11 Glyoxalase I (EC 4.4.1.-)	Leishmania braziliensis
E9AWE0	R.ILTSNCGANVIR.V	551	60174,3	1	1	0,02 T-complex protein 1 subunit gamma	Leishmania mexicana
A0A088RL05	K.YENAQPTYSGNTVVK.C K.ISFEANPIPK.A K.DNGNGLLFR.I	115	13057,2	3	3	0,3 Calpain-like cysteine peptidase, putative	Leishmania panamensis
A0A088RLB6	K.LNRPGANQAVTASQSTEANR.G	138	15409,7	1	1	0,14 Prefoldin subunit 2, putative	Leishmania panamensis
R4NHU5	R.INVESAINQIAFSPNR.F K.DVLAVAFSPDDR.L	287	31527,5	2	2	0,1 Activated protein kinase c receptor (Fragment)	Leishmania braziliensis
A0A088RKD8	K.SLEQVYLQGTR.V	794	84537,6	1	1	0,01 Surface antigen protein, putative	Leishmania panamensis
A0A088S3Y6	R.ECTSAADSAPCFR.C	135	14538,5	1	1	0,1 Poly-zinc finger protein 2, putative	Leishmania panamensis
A0A088RKE3	R.ASM(+15.994900)GLIITEATQIEK.G R.ATVPSNVDEGVR.I R.IVAPSAVAITDHECPGAFAR.N R.GDFFSQACGADK.W	382	41074	4	6	0,15 NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase, putative	Leishmania panamensis
A0A088S0U8	R.M(+15.994900)FNETDFEGR.R R.NQGTILFVGNLFPQTPWQHVK.D R.KFDDGPRPPLVQR.D	275	30187,8	3	3	0,16 RNA-binding protein, putative	Leishmania panamensis
A4H6R7	R.SGSAADTQALAER.V K.SECVAFQCQR.A	283	30261,9	2	2	0,08 Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1)	Leishmania braziliensis
E9AE37	R.SQLDATQLAQVPTR.T	595	68972	1	1	0,02 Putative paraflagellar rod protein 1D	Leishmania major
A0A088S3K7	R.LSVQPVGAAEYAYVLR.M	164	18942,6	1	1	0,1 Uncharacterized protein	Leishmania panamensis

A4HBF5	R.AEAM(+15.994900)QILTDCLR.V	220	24559,1	1	1	0,05 Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1)	Leishmania braziliensis
A4HG53	K.AFAAM(+15.994900)IESM(+15.994900)LYEAR.F K.ECFVIISDKR.L R.FGPWFVPEPVIGSIDK.S	205	22523,2	3	3	0,19 Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1)	Leishmania braziliensis
A0A088527	R.AFAFM(+15.994900)DINPLSR.G K.IITGEIPCAK.V	142	15619	2	2	0,15 Uncharacterized protein	Leishmania panamensis
A0A088RK95	R.NIELLVLQHR.D K.SLLEVVESGSR.N K.GLAAVGVLR.D R.YLTEEELQR.F	247	27887,2	4	4	0,16 Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	Leishmania panamensis
E9B7N7	R.LSGSNDKPGAGQFVTR.F	560	61883	1	1	0,03 Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative	Leishmania donovani
A4IDA9	K.ATDVANSSLAPTHPIR.L R.NLLSVAYK.N	258	29694,1	2	3	0,09 14-3-3 protein-like protein	Leishmania infantum
K4PXL4	R.VNPEQHNVLTEAPM(+15.994900)NPK.Q	376	42047,7	1	1	0,05 Actin	Leishmania donovani PE
Q4Q4A0	R.GLSAM(+15.994900)AQVESLR.F R.ELTACIQQR.F K.LLSNLQVR.R	219	24437,9	3	4	0,1 Putative 40S ribosomal protein S3	Leishmania major
A0A088RSN4	R.YEGHLHSINTDENTVSLSNVR.I R.GSDIKDLTVFR.D	294	31950,4	2	2	0,11 Uncharacterized protein	Leishmania panamensis
A0A088RPL9	R.ELGVVLFV.V R.ISM(+15.994900)SDFSVMK.Q	280	32985,8	2	2	0,06 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase, putative	Leishmania panamensis
A0A088RSM9	K.YCSAASAQQAVNELNGFNILNK.R R.YGPIETVK.I	168	18969,1	2	2	0,18 RNA-binding protein, putative, UPB2	Leishmania panamensis
E9AVH5	K.SGVGVVAHLGILHADR.I	187	18807,7	1	1	0,08 Putative vacuolar ATP synthase (EC 3.6.3.14)	Leishmania mexicana
A0A088S6P9	K.ANFFEAIK.V R.LSSWPVGVHSSVVLQVK.E	351	38221,1	2	2	0,07 Activator of Hsp90 ATPase, putative	Leishmania panamensis
A0A088RI26	R.VQALVQFDAR.E	315	35128,1	2	2	0,08 RNA-binding protein, putative	Leishmania panamensis

A4HPM9	R.NNEIGNTSSVIHM(+15.994900)R.N	103	11712,8	1	1	0,21 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4H7S2	R.IQELFDSLVDVNHSGAVPVEVVK.N	153	16704,4	1	1	0,1 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HKH1	K.TPEEIETM(+15.994900)ITNAAPK.S	208	23066	3	5	0,22 Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	Leishmania braziliensis
A4HFD7	K.VASAISEFGSFAR.F M.PFCAQALPYDYGALSSK.G K.LNAAAESNSEVSSK.S	238	25440,6	3	4	0,18 Putative proteasome alpha 7 subunit (EC 3.4.25.1)	Leishmania braziliensis
A4HMA7	K.LNFASLTCEEAVGK.L K.AVDNSSTAVAACCK.D R.DIFSTPIHGAVLANR.V	222	24023,3	3	3	0,27 Putative proteasome activator protein pa26	Leishmania braziliensis
A4HFB4	K.PYTADAAETVPVSVVASLR.E K.SAAPSVLM(+15.994900)ELQQIDADALLK.L K.LLGSGGDKDGGVPCVAGM(+15.994900)YATR.D	267	28566,8	2	2	0,1 6-phosphogluconolactonase (EC 3.1.1.31)	Leishmania braziliensis
A4HA16	K.SVPVVLALSGGSTPK.R K.ICENLSQM(+15.994900)SFAAR.E	528	57972,2	1	1	0,03 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4H7J0	K.VANTVESLQYDSSFTAK.N	285	32142,7	1	1	0,05 Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	Leishmania braziliensis
A4HI30	K.VSASSADELLDPFK.H R.GPGTAIYFGLAAVSVLK.S K.VTLASVM(+15.994900)ESK.S K.SPDLAEQLAK.A	180	18780,7	3	3	0,21 Putative 4-methyl-5(Beta-hydroxyethyl)-thiazole monophosph	Leishmania braziliensis
A4HBQ1	K.VVAEALAGSDK.L	336	36671,9	1	1	0,03 Putative la RNA binding protein	Leishmania braziliensis
A4H5B4	K.AEAAAASQAQQISLK.V R.FLFDGAPIDESK.T	117	12466,1	2	2	0,23 Putative small ubiquitin protein	Leishmania braziliensis
A4H907	K.GAQPWAVQVEAR.A K.LLVEVTSEK.G	96	10539,2	2	2	0,22 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HCQ7	K.NCGPHNLHGGPVGFKNK.E	408	44361,7	1	1	0,04 Aldose 1-epimerase-like protein (EC 5.1.3.3)	Leishmania braziliensis
A0A088RIB2	K.NVFLSNVVALTFK.E R.EFAGSVEGVVDSFVTR.H	679	75956,5	8	8	0,15 Dipeptidyl-peptidase III, putative (EC 3.4.14.4)	Leishmania panamensis

	K.LLENSDGTFFNFDK.N R.AGLVGLFYTPEK.H K.DVGPTVETNIGFIESYR.D R.EDAVVANDFLALK.R R.FCILQALVR.A R.YYSPNITR.E							
A4H9R6		118	13098,5	1	1	0,19	Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
	R.LNETIPNSCSTTNTGNTPFALVR.K							
O76958		514	55582	8	21	0,22	Heat shock protein 70 (Fragment)	Leishmania braziliensis
	R.IINEPTAAAIAYGLDK.R K.DCHLLGTFDLSGIPPAPR.G K.SQIFSTYADNQPGVHIQVFEGER.A K.DAGTIAGLEVL.R K.NGLENYAYSM(+15.994900)K.N K.VQSLVSDFFGGK.E R.LVTFFSEEFK.R K.ELESTCNPIM(+15.994900)TK.M							
E9JU4		483	52312,3	6	7	0,22	Trypanothione reductase (Fragment)	Leishmania braziliensis
	K.TSVDNIYAIGDVTDR.L K.VACAVFSIPPIGTCGLTEEEAAK.K K.EHGPPCFAALGGTCVNVGCVPK.K R.TPAYFYEK.G K.KYDVVAVYESSFTPLM(+15.994900)HNISGSK.H K.KLM(+15.994900)VTGAQYM(+15.994900)DLIR.E							
A0A088RJU5		124	13799,8	2	2	0,19	Nuclear transport factor 2, putative	Leishmania panamensis
	R.FANLGFAEAAFK.Q K.EQVQGVDAIM(+15.994900)AR.F							
A0A088RKN0		138	16045,9	3	3	0,3	Ubiquitin-conjugating enzyme-like protein (EC 6.3.2.19)	Leishmania panamensis
	R.ILSLEIYCDENYPK.V K.VNLPCVDPDGTVNR.N K.ATGSNQNVSVGLR.D							
A4HJ18		450	50314,2	7	8	0,23	TDR1 protein	Leishmania braziliensis
	R.ETVPTLEVGCPEP.R R.LATGDTVLPVPR.G K.HPFGEPPFFGGK.R K.TM(+15.994900)NAGDVAILPFLVR.V R.ASVLETLPTAEQCVENYR.H K.SLTPELTNGYDFFAK.F K.FPLLNELAEAGM(+15.994900)VTPEAK.A							
A0A088RHF2		403	45280,5	10	19	0,27	Eukaryotic initiation factor 4a, putative	Leishmania panamensis
	R.VLVTTDLVAR.G							

A0A088S522	K.FCETFVGGTR.V K.TGAFSIGLLQR.L R.GGDIIAQAQSGTGK.T K.LQAGVVAVGTPGR.V R.ELALQTAEVISR.I R.IGEFLSNSAK.F R.ESLTLEGIK.Q R.VSDVIKR.G K.GVAINFVTEK.D	199	22164	3	3	0,16 Uncharacterized protein	Leishmania panamensis
A4H7H9	R.QQFLQAHTVNSQSNFR.A R.AQLSHVLAGEELESNGPRPK.V R.LSPPHIVYDEGK.M	199	22173,1	3	3	0,16 Uncharacterized protein	Leishmania braziliensis
A4HHC7	R.AQLSHVLAGEELESNGPRPK.V R.LSPPHIVYDEGK.M K.NYAAVSNLSVM(+15.994900)SCPM(+15.994900)AFVIK.D	144	16276,1	5	5	0,31 TXN1 protein	Leishmania braziliensis
A0A088R XR7	R.HLVEGLTK.A R.GFTPLLIIFYEK.Y K.MPWLAIPFSQR.H K.M(+15.994900)PWLAIPFSQR.H K.QQSEVSVSLSGK.T	144	16266	4	5	0,33 Tryparedoxin	Leishmania panamensis
A4HB57	K.MPWLAIPFSQR.H K.M(+15.994900)PWLAIPFSQR.H K.TFNVGSIPTVIGVCADTGDDVVTTTR.A K.QQSEVSVSLSGK.T	301	32771,1	1	1	0,06 Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	Leishmania braziliensis
A4H7P6	R.IYPGQSCAIVLQDLGAK.A	846	90974,5	3	3	0,04 Putative immunodominant antigen	Leishmania braziliensis
A4HFY0	R.FATVLVDAVK.E K.LTGVAEPALQR.T K.LISEYSTSM(+15.994900)LEAK.L	401	44115,5	1	1	0,04 Putative branched-chain amino acid aminotransferase (EC 2.6.	Leishmania braziliensis
A4HEA3	K.VGANYAGPLLVDQDEAK.A K.GIDIAFLGQNDLCM(+15.994900)SM(+15.994900)GLYDGR.Y R.YVFPQM(+15.994900)YFSPQLQAATDTLISTAK.K K.GLLGYVPESNK.N R.AGIQCALDSGADGVLIPYVNNALQELQDAVSCCYPTTGTR.S	279	30140	4	5	0,35 Putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase (EC 4	Leishmania braziliensis

A4HP21	K.SCYNCGSTEHLR.E K.SCFNCGSTEHLR.E R.SCYNCGGTGHLSR.D	115	12579,4	3	7	0,34 Putative universal minicircle sequence binding protein (Univer: Leishmania braziliensis	
A4HIW5	K.LLADAVVTGSEAAVAEYSAPLR.A R.SNLLDAYQLLASLR.K	770	85859,3	2	2	0,05 Putative 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocystein	Leishmania braziliensis
A4HQJ7	K.IDLPVGTVTSLFASYK.K R.VEVAAGHGFGKPIK.T R.VTAM(+15.994900)LNYAR.T	697	78266,9	3	3	0,06 Putative prolyl oligopeptidase (EC 3.4.21.26)	Leishmania braziliensis
A4H9X3	R.VITAAYNILNTALR.Q K.KIEPITGLKPQK.A K.VTPADGVLSHM(+15.994900)M(+15.994900)K.R	380	42264,4	3	5	0,1 Putative aminopeptidase	Leishmania braziliensis
A4HDD4	R.IVVFAGAGAAVGVAK.N	571	62694,3	1	1	0,03 Malic enzyme	Leishmania braziliensis
A0A088SFX4	R.EATM(+15.994900)VNAIAEEFGVK.S	263	28515,4	1	1	0,06 Biotin/lipoate protein ligase-like protein (EC 6.3.4.15)	Leishmania panamensis
A4H5Q8	R.SAGGLLVGTVLNM(+15.994900)RPDLFK.A	731	83024,8	1	1	0,03 OPB protein (EC 3.4.21.83)	Leishmania braziliensis
A0A088RVH3	K.VAFVENVAELVK.S K.GFTTNYGLTESIFCQAK.V	194	22226,4	2	2	0,15 Prefoldin-like protein	Leishmania panamensis
A4HMZ0	R.LTQNILGNLM(+15.994900)SPQVAFLLQTVK.T R.VVYSGLASHPQK.E R.SANPTVAVLEQR.L	410	44566,4	3	3	0,11 Putative cystathione gamma lyase (EC 2.5.1.-)	Leishmania braziliensis
A0A088RZX6	R.GQEVSVATAIAR.S R.HNCPSRPDQVSEIVK.H	527	56121,1	2	2	0,05 Aminopeptidase, putative (EC 3.4.11.-)	Leishmania panamensis
A0A088RSB5	R.YTETSYDK.A R.VVDVVHNNR.Y K.AFQANAAAFVK.K	170	19196,3	3	3	0,16 Translationally controlled tumor protein (TCTP), putative	Leishmania panamensis
A4H639	K.EFSVFSDAAR.C K.VTGM(+15.994900)TGDVCGEFK.V R.IAVSTADLTDPDYHCTR.V	611	66089,7	3	4	0,07 GP63, leishmanolysin (EC 3.4.24.36)	Leishmania braziliensis
A4H638	K.VTGM(+15.994900)TGDVCGEFK.V	589	62623,7	6	9	0,12 GP63, leishmanolysin (EC 3.4.24.36)	Leishmania braziliensis

	R.IAVSTADLTDPDYHCTR.V						
	R.ASETSSDM(+15.994900)QAFNVFSDAAR.C						
	K.VTGM(+15.994900)TGDVCGEFKVPAAHVAK.C						
	R.EDVTYAGM(+15.994900)CANVK.C						
	R.EDVTYAGMCANVK.C						
AOA088RY34		267	28901,8	1	1	0,06 Enoyl-CoA hydratase/isomerase-like protein	Leishmania panamensis
	R.TFSEGVQSNDFSALTR.M						
AOA088S3R9		317	33394,3	1	1	0,05 Ubiquitin-like protein, putative	Leishmania panamensis
	K.NQIAETLAIPAEQR.I						

ID: código da proteína no UNIPROT; **PI:** peptídeos identificados; **NA:** número de aminoácidos; **MM:** massa molecular em daltons (Da); **NP:** número de peptídeos identificados; **NS:** número de espectros correspondentes aos peptídeos; **C:** cobertura.

8.5. Proteomics Advances in the Study of *Leishmania* Parasites and Leishmaniasis

Capítulo de livro publicado na revista “Sub-cellular Biochemistry” 2014; 74: 323-49.

Chapter 14

Proteomics Advances in the Study of *Leishmania* Parasites and Leishmaniasis

Jose Batista de Jesus, Camila Mesquita-Rodrigues, and Patricia Cuervo

Abstract *Leishmania* spp. are digenetic parasites which cause a broad spectrum of fatal diseases in humans. These parasites, as well as the other trypanosomatid, regulate gene expression at the post-transcriptional and post-translational levels, so that a poor correlation is observed between mRNA content and translated proteins. The completion of the genomic sequencing of several *Leishmania* species has enormous relevance to the study of the leishmaniasis pathogenesis. The combination of the available genomic resources of these parasites with powerful high-throughput proteomic analysis has shed light on various aspects of *Leishmania* biology as well as on the mechanisms underlying the disease. Diverse proteomic approaches have been used to describe and catalogue global protein profiles of *Leishmania* spp., reveal changes in protein expression during development, determine the subcellular localization of gene products, evaluate host-parasite interactions and elucidate drug resistance mechanisms. The characterization of these proteins has advanced, although many fundamental questions remain unanswered. Here, we present a historic review summarizing the different proteomic technologies applied to the study

J.B. de Jesus (✉)

Departamento de Engenharia de Biosistemas, Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei, MG, Brazil

Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas,
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
e-mail: jbj@ioc.fiocruz.br

C. Mesquita-Rodrigues

Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas,
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

P. Cuervo

Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz,
FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

of *Leishmania* parasites during the last decades and we discuss the proteomic discoveries that have contributed to the understanding of *Leishmania* parasites biology and leishmaniasis.

Abbreviations

1DE	One dimensional electrophoresis
2D-DIGE	Two dimensional differential gel electrophoresis
2DE	Two dimensional electrophoresis
2D-LC-MS/MS	Two dimensional liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
ATP	Adenosine triphosphate
BLAST	Basic local alignment search tool
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid
ESI	Electrospray ionization
ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry
GFP	Green fluorescent protein
GO	Gene ontology
GP46	Glycoprotein 46
GP63	Glycoprotein 63 also called leishmanolysin and major surface peptidase
GTP	Guanosine triphosphate
HSP60	Heat shock protein 60
HSP70	Heat shock protein 70
HSP90	Heat shock protein 90
HSP100	Heat shock protein 100
IEF	Isoelectric focalization
IgG	Immunoglobulin g
IgM	Immunoglobulin m
iMAC	Metal affinity chromatography
iTRAQ	Isobaric tags for relative and absolute quantification
KMP-11	Kinetoplastid membrane protein 11
LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometers
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
MALDI-MS	Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry
MALDI-MS/MS	Matrix assisted laser desorption ionization tandem mass spectrometry
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MUDPIT	Multidimensional protein identification
PTMs	Post translational modifications
Rab7	Ras-related protein 7

RNA	Ribonucleic acid
SbIII	Trivalent antimonials
SbV	Pentavalent antimonials
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SHERP	Small hydrophilic endoplasmic reticulum-associated protein
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SKRP	Small-kinetoplastid-related-protein
TCA	Trichloroacetic acid
Th1	T helper 1
WHO	World health organization

1 Proteomics Technologies Applied to the Study of *Leishmania* Parasites

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* are the etiological agents of leishmaniasis, a complex of diseases that presents a wide spectrum of clinical manifestations ranging from self healing cutaneous lesions to disseminated, mucocutaneous and visceral infections (Murray et al. 2005). Although the establishment of the primary *Leishmania* infection and the development of the clinical symptoms of leishmaniasis depend on the host immune response, the genetic content of each different species and isolate can also influence the course of the disease (Murray et al. 2005; Reithinger et al. 2007). To date, the genomes of four different *Leishmania* species have already been sequenced and annotated (Ivens et al. 2005; Peacock et al. 2007; Rogers et al. 2011). Comparative genomic analyzes revealed that most of the genes (7392) are conserved between the four species while 14, 19, 67 and 2 genes are specific to *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) braziliensis* and *L. (L.) mexicana*, respectively (Rogers et al. 2011). In trypanosomatids, the absence of RNA polymerase II promoters leads to the formation of constitutively expressed polycistronic precursor mRNAs. Thus, the expression of individual genes is controlled mainly at the post-transcriptional level, depending on mechanisms that (i) stabilize the RNA, (ii) initiate translation and (iii) stabilize the protein translated (Clayton 2002; Haile and Papadopoulou 2007). For this reason, most of the genes are conserved among the *Leishmania* species and a poor correlation is observed between the transcripts and the proteins expressed by the parasite. In this sense, proteomics is the most suitable tool for the identification of virulence markers, control targets and mechanisms of drug resistance (Cuervo et al. 2010; Paape and Aebischer 2011).

One-dimensional electrophoresis and the Edman sequencing were seminal biochemical techniques for the structural characterization of proteins and for the determination of its molecular weight (Laemli 1970; Matsuidara 1987). Since 1975, the two-dimensional electrophoresis (2DE) has been improved allowing the simultaneous determination of the molecular weight and the isoelectric point of proteins (O'Farrel 1975). By introducing this methodology, it was possible to separate a large amount of proteins and generate descriptive maps for various biological

systems. In the early eighties, the first protein maps of *Leishmania* spp. were published using the 2DE technique. In these studies, the authors searched for virulence markers (Handman et al. 1981) and proteins capable of differentiating between species (Saravia et al. 1984). However, during this period, the lack of reproducibility of 2DE plus the absence of high-throughput protein identification methods made the maps essentially descriptive. The identification of proteins and peptides by mass spectrometry only became possible in the late 80s, when two soft ionization techniques allowed the conversion of these molecules into intact ions. Until the current days, matrix assisted laser ionization/desorption (MALDI) and electrospray ionization (ESI) are the most commonly used techniques to ionize proteins and peptides prior to the analysis by mass spectrometry (Karas and Hilenkamp 1988; Tanaka et al. 1988; Fenn et al. 1989). While the MALDI-MS is used to analyze simple mixtures of peptides (for example, those previously fractionated by 2DE), the ESI-MS, integrated with systems of liquid chromatography, is more suitable for the identification of proteins in complex samples (Aebersold and Mann 2003). The improvement of techniques for the ionization of proteins and the development of methods for appropriate lysis of *Leishmania* led to the production of several protein maps of this parasite (Acestor et al. 2002). At first, most of these maps used 2DE to report proteins expressed by different species of *Leishmania* spp. (Góngorra et al. 2003; Brobey et al. 2006; Cuervo et al. 2007) or proteins differentially expressed according to the developmental stage of the parasite (El Fakhry et al. 2002; Bente et al. 2003; Nugent et al. 2004; Walker et al. 2006). In this period, protein spots were detected by staining the gels with silver or colloidal Coomassie G-250. However, in order to analyze quantitative differences among the spots detected, various studies started using fluorescent dyes, mainly the Cy Dyes (Morales et al. 2010; Pescher et al. 2011) and Sypro Ruby (Morales et al. 2008). Although the use of fluorescent dyes has turned 2DE into a quantitative tool of high sensitivity, linearity, and dynamic range, the separation of proteins by gel limits the applicability of the technique to the resolution of soluble and abundant proteins (Bantscheff et al. 2007; Görg et al. 2009). These limitations have been surpassed by the development of *shotgun proteomics* techniques such as Multidimensional Protein Identification (MudPIT) that uses liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometers (LC-MS/MS) for the identification and characterization of proteins within complex biological systems (Domon and Aebersold 2006). The LC-MS/MS is not a quantitative technique by itself and can be used as a descriptive tool. However, in general, most of the proteomic studies aim to compare two or more physiological conditions within a biological system. For this purpose, the labeling of peptides with stable isotopes is the most used approach for the quantification of proteins analyzed by LC-MS/MS. Labeling based on Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification (iTRAQ), Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC) and Metal Affinity Chromatography (iMAC) have been used in several proteomic analysis of *Leishmania* parasites, enabling not only the quantification of proteins but also the characterization of post-translational modifications (Rosenzweig et al. 2008a; Chawla et al. 2011; Hem et al. 2010; Biyani and Madhubala 2012).

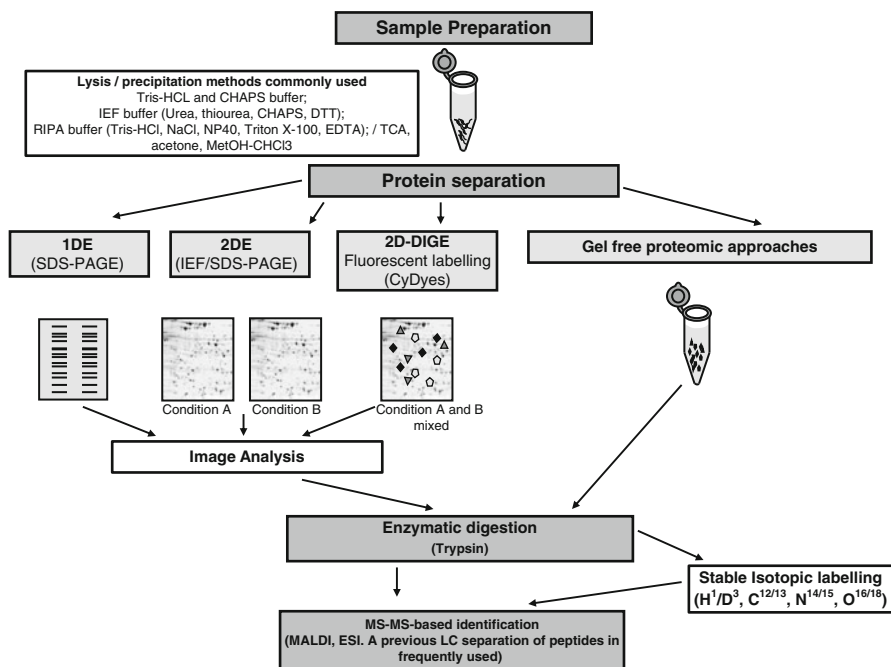


Fig. 14.1 Common gel-based and gel-free approaches used in proteomic studies of *Leishmania* parasites. Before protein separation, *Leishmania* parasites are lysed and precipitated using different methods, some mentioned above. Gel-based approaches include separation of proteins in one dimension according to their molecular weights by SDS-PAGE or in two dimensions, using isoelectric focalization (IEF) and SDS-PAGE. Then, different conditions can be analyzed and compared. In 2D-DIGE, various fluorescent CyDyes are used to label proteins in different samples which are mixed before separation by 2DE. Differences in the levels of individual protein spots are determined after image analysis. Finally, the selected gel bands/spots are enzymatically digested, which is done mainly by trypsin. In quantitative gel free proteomic approaches, proteins undergo direct enzymatic digestion, which can be followed by stable isotopic labelling of peptides. Here, it is important to note that both peptides and proteins can be chemically labelled by isotopes. Metabolic labelling of live cells in culture by SILAC is another common quantification methods. After digestion, proteins are identified by mass spectrometry

The proteomics technologies enable the mapping and the identification of proteins found on the cell surface, within the cytosol or secreted into the extracellular medium. In turn, these proteins may be involved in diverse mechanisms such as cytoadhesion, cell invasion, differentiation and cell cycle progression. As protein expression in protozoa of the genus *Leishmania* is regulated at the post-transcriptional level, the different proteomic approaches can assist in the discovery of novel metabolic pathways and potential therapeutic targets. In this chapter, it is intended to discuss how different proteomic methodologies have contributed to the understanding of the biology of *Leishmania*, giving emphasis to the advancements made until the current day and perspectives (Fig. 14.1).

2 Comparative Proteomic Analysis Between Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania* spp

In *Leishmania* species, the differentiation from the promastigote to amastigote form is triggered by several environmental changes such as (i) elevation of temperature, (ii) decrease of pH within the phagolysosome, (iii) increased exposure to oxygen and nitrogen reactive species, (iv) intense extracellular proteolytic activity and (v) nutritional starvation (Besteiro et al. 2007). Promastigotes and amastigotes of *Leishmania* show different mRNA levels for genes associated with protein translation, signal transduction and carbohydrate metabolism (Leifso et al. 2007). However, most of the *Leishmania* genome is reported to be constitutively expressed, with limited stage specific mRNA expression (Leifso et al. 2007; Rochette et al. 2008; Deplege et al. 2009; Adai et al. 2011). Thus, the proteome has been widely used for the comparative study between the different stages of *Leishmania*. In the studies quoted below, the authors attempted to detect proteins as well as post-translational modifications and isoforms of proteins involved in the cellular differentiation of the parasite during its life cycle. A summary of the major proteins highlighted by the authors in such studies is presented in Table 14.1.

The first comparative proteomic analyzes were carried out by 2DE and detected 2,000 protein spots in both promastigotes and axenic amastigotes of *L. (L.) infantum*, *L. (L.) donovani* and *L. (L.) mexicana* (El Fakhry et al. 2002; Bente et al. 2003; Nugent et al. 2004). For the three species, about 3-5 % of the spots were considered to be differentially expressed. The comparative proteomic analysis of *L. (L.) infantum* detected 62 spots exclusive to the amastigote form of the parasite. However, after digestion and analysis of the peptides by mass spectrometry, only two proteins were identified: isocitrate dehydrogenase and triosephosphate isomerase involved in the Krebs cycle and in the glycolytic pathway respectively (El Fakhry et al. 2002). At that time, the genome of *L. (L.) major* was not available and the obtained amino acid sequences were identified by homology-based search using the *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) algorithm (Altschul et al. 1990). After the genome of *L. (L.) major* was sequenced and made available in a public database, the number of identified proteins increased considerably. Of 104 spots regulated during *L. (L.) donovani* differentiation, 67 proteins were identified (Bente et al. 2003). In a similar way, 47 proteins were identified from 147 spots differentially expressed by promastigotes and amastigotes of *L. (L.) mexicana* (Nugent et al. 2004). In general, these studies agreed that the glycolytic pathway is more active in promastigotes while amastigotes use the fatty acid oxidation and gluconeogenesis as their main energy sources (Bente et al. 2003; Nugent et al. 2004). Also, differentially regulated proteins in promastigotes and amastigotes were gathered in several functional categories such as: (i) cytoskeleton components, (ii) response to stress, (iii) amino acid metabolism, (iv) carbohydrate metabolism, (v) detoxification and (vi) proteolysis, indicating that the parasites of the genus *Leishmania* undergo a variety of metabolic changes during their differentiation (Bente et al. 2003; Nugent et al. 2004).

Table 14.1 Metabolic pathways and proteins highlighted by the authors which are up (+) or down-regulated (-) during *Leishmania* spp. differentiation from (i) procyclic to metacyclic promastigote and (ii) from promastigote to amastigote form

(i) From procyclic to metacyclic promastigote		
Metabolic pathways and proteins	<i>Leishmania</i> species	References
Paraflagellar rod protein 1D (+) α and β -tubulin (+)	<i>L. (L.) major</i>	Mojtahedi et al. 2008
Cysteine proteinase b (+) Trypanoredoxin (+)	<i>L. (L.) mexicana</i>	Nugent et al. 2004
RNA helicase (-)	<i>L. (L.) major</i>	Mojtahedi et al. 2008
GP63 and GP46 (+)	<i>L.(L.) infantum</i>	Yao et al. 2010
Metabolic enzymes (-)	<i>L.(L.) infantum</i>	Yao et al. 2010
Transporters nutrient and protons (-)	<i>L.(L.) infantum</i>	Yao et al. 2010
(ii) From promastigote to amastigote		
Glycolytic pathway (-) Fatty acid oxidation (+)	<i>L. (L.) donovani,</i> <i>L. (L.) mexicana,</i> <i>L. (L.) infantum</i>	Bente et al. 2003, Nugent et al. 2004, Rosenzweig et al. 2008a, Brotherton et al. 2012, Paape et al. 2010
Gluconeogenesis (+)	<i>L. (L.) donovani,</i> <i>L. (L.) mexicana,</i> <i>L. (L.) infantum</i>	Bente et al. 2003, Nugent et al. 2004, Rosenzweig et al. 2008a, Brotherton et al. 2012, Paape et al. 2010, Biyani and Madhubala 2012
Mitochondrial respiration (+)	<i>L. (L.) donovani</i>	Bente et al. 2003, Rosenzweig et al. 2008a, Biyani and Madhubala 2012
Stress response/heat shock proteins (+)	<i>L. (L.) donovani,</i> <i>L. (L.) mexicana,</i> <i>L. (V.) panamensis</i>	Bente et al. 2003, Nugent et al. 2004, Walker et al. 2006, Rosenzweig et al. 2008a, Morales et al. 2008, Morales et al. 2010, Hem et al. 2010, Biyani and Madhubala 2012
Protein synthesis (-)	<i>L. (L.) donovani</i>	Rosenzweig et al. 2008a, Biyani and Madhubala 2012
Proteins with basic pH (+)	<i>L. (L.) mexicana</i>	Paape et al. 2008, 2010
Rab 7 and GTP-binding protein (+)	<i>L. (L.) donovani</i>	Biyani and Madhubala 2012
Trypanoredoxin peroxidase (+)	<i>L. (L.) donovani</i>	Pescher et al. 2011
Methylthioadenosine phosphatase (+)	<i>L. (L.) donovani</i>	Pescher et al. 2011

Proteins expressed by promastigotes and amastigotes belonging to the *Leishmania* (*Viannia*) subgenus were also mapped by 2DE. In the single comparative study carried out, 11 spots expressed uniquely by *L. (V.) panamensis* amastigotes were analyzed by mass spectrometry (Walker et al. 2006). Six spots were identified as 7 distinct proteins belonging to diversified functional classes such as: (i) carbohydrate metabolism (fructose 1,6-bisphosphate aldolase, glucose 6-phosphate dehydrogenase

and pyruvate dehydrogenase), (ii) stress response (heat shock protein HSP83), (iii) cytoskeleton components (tubulin), (iv) amino acid metabolism (cysteine synthase) and (v) cell cycle regulation (*ran*-binding protein) (Walker et al. 2006). Subsequently, the first reference map for the promastigote form of *L. (V.) braziliensis* was generated, in which 101 spots were detected and 75 proteins were identified by MALDI-MS/MS. Among the proteins identified in this study, the authors highlighted the importance of “elongation factor 1-beta” that has been associated with the metastatic spread of *L. (V.) braziliensis* and may have influence on the biological behavior of the species, which is responsible for distinct clinical manifestations of cutaneous leishmaniasis (Cuervo et al. 2007).

The differentiation from non-infective procyclic promastigotes into metacyclic infective parasites is essential for the infection of the vertebrate host, being a prerequisite for resistance to complement-mediated lysis and intracellular survival (Franke et al. 1985). Promastigotes cultured *in vitro* undergo metacyclogenesis during the stationary phase of growth, which is characterized by inhibition of cell division and down-regulation of protein synthesis (Sacks and Perkins 1984). Nevertheless, some proteins such as “cysteine proteinase b” and “small hydrophilic endoplasmic reticulum (ER)-associated protein” (SHERP) are up-regulated in metacyclic promastigotes (Mottram et al. 1997; Knuepfer et al. 2001). Separation of proteins by 2DE revealed 1,200 spots belonging to both procyclic and metacyclic promastigotes of *L. (L.) major* (Mojtahedi et al. 2008). Of this total, 19 isoforms of proteins were considered to be differentially expressed. Proteins with synthetic activity, such as RNA helicase, were down-regulated in metacyclic promastigotes, what is in agreement with the general down-regulation of protein synthesis reported previously (Sacks and Perkins 1984). On the other hand, proteins involved with the parasite motility, such as “paraflagellar rod protein 1D”, “ α -tubulin” and “ β -tubulin” were up-regulated in metacyclic promastigotes (Mojtahedi et al. 2008). Another comparative analysis, this time between procyclic and metacyclic promastigotes of *L. (L.) infantum*, revealed 52 spots which were differentially expressed during the metacyclogenesis (Nugent et al. 2004). The most interesting findings of this study were (i) the identification of “cysteine proteinase b” exclusively in the metacyclic promastigotes and (ii) the up-regulation of “trypanoredoxin” in these parasites (Nugent et al. 2004). These enzymes have been detected in metacyclic forms of *Leishmania* by other biochemical methods and their up-regulation in such infective stage, identified by 2DE, confirm their importance as virulence factors.

All the studies discussed above detected proteins of high abundance (such as α and β tubulin) on their maps. These proteins undergo extensive modifications and have multiple isoforms that hide the low abundance proteome. In order to increase the coverage of proteins detected, two pre-fractionation methods have been developed by independent groups enabling the identification of new protein isoforms differentially expressed in promastigotes and amastigotes of *L. (L.) infantum*. The first methodology used digitonin to permeabilize the cell membrane and allowed the detection of 3,186 spots, of which 42 were differentially expressed (Foucher et al. 2006). Another pre-fractionation strategy, using ammonium sulfate, allowed the detection of 2,200 spots and the identification of 168 proteins of *L. (L.) infantum*

of which 76 were differentially expressed by promastigotes and axenic amastigotes (McNicoll et al. 2006). Although the number of identifications increased after the use of pre-fractionation methods, there was not a corresponding increase in the differentially expressed proteins of *L. (L.) infantum*. Also, McNicoll et al. (2006) observed a poor correlation between mRNA transcribed and differentially expressed proteins derived from the same gene. The same study detected multiple protein isoforms related to the same gene, indicating that these proteins undergo post-translational modifications (McNicoll et al. 2006). Further analysis complemented this result demonstrating that promastigotes and amastigotes of *L. (L.) major* express 94 % of its mRNA constitutively (Leifso et al. 2007).

The comparative proteomic studies previously described in this review have focused on two or three stages of *Leishmania* differentiation and used 2DE for the mapping of differentially expressed proteins. Rosenzweig and colleagues (2008a) used an axenic differentiation model and a quantitative approach based on iTRAQ to analyze in detail the changes in protein expression during the differentiation of *L. (L.) donovani*. The analysis by LC-MS/MS identified and quantified 21 % of the proteome of the parasite during 7 stages of the differentiation. Also, iTRAQ analysis detected many enzymes and allowed the authors to create a dynamic metabolome of *L. (L.) donovani* differentiation (Rosenzweig et al. 2008a). Briefly, during differentiation, fatty acid oxidation became the main source of metabolic energy of these parasites and enzymes in the glycolytic pathway became down-regulated. In turn, differentiating parasites up-regulated gluconeogenesis and started producing sugars from glycerol and amino acids. In line with the increased oxidation capacity, Krebs cycle enzymes, respiratory chain and oxidative phosphorylation proteins were up-regulated. Down-regulation of proteins from the translational machinery and an increase in the condensation of the DNA were also observed. As expected, most changes in proteins of physiological significance occurred during the third and fourth differentiation stages, when promastigotes initiated their morphological transition into amastigotes (Rosenzweig et al. 2008a).

Most of the comparative proteomic analyzes among the different *Leishmania* stages used axenic amastigotes, maintained in culture medium with pH and temperature similar to those within the intracellular environment. Although axenic amastigotes can display some biochemical markers of the intracellular form, they cannot be grown from all species of *Leishmania* (Holzer et al. 2006). Furthermore, microarray analysis has demonstrated that axenic amastigotes are more closely related to promastigotes than the intracellular amastigotes (Holzer et al. 2006). In order to obtain intracellular amastigotes free from contaminants of the host cell, Paape et al. (2008) used fluorescent transgenic promastigotes of *L. (L.) mexicana* to infect mice *in vivo* and macrophages *in vitro*. The amastigotes obtained were further purified by lysis, centrifugation and sorting by flow cytometry. For comparative analysis, the soluble proteins from both promastigotes and amastigotes were processed for analysis by 2DE and MALDI-MS/MS, while the insoluble material was separated by 1DE and analyzed by LC-MS/MS. In total, 509 proteins were identified, of which 301 were specific of promastigotes, 51 were specific of amastigotes and 187 were common to both stages (Paape et al. 2008). Although results from samples analyzed by

MALDI-MS/MS and LC-MS/MS were complementary (having only 10 % of the proteins identified in both sets) comparison with the genome sequence-predicted proteome revealed only 6 % of coverage (Paape et al. 2008). To increase the total number of identifications and detect putative proteins secreted by the intracellular form of *L. (L.) mexicana*, the purification of amastigotes by fluorescence activated sorting was combined with a high resolution gel free proteomic analysis (Paape et al. 2010). In total, 1,764 proteins were identified, of which 741 had not been reported in previous studies. Also, the analysis of the supernatant allowed the identification of 143 proteins possibly secreted by *L. (L.) mexicana* amastigotes (Paape et al. 2010). Despite the use of different techniques, both studies agreed on some major points. Firstly, several proteins with enzymatic function in intracellular amastigotes were detected, indicating that adaptation to the intracellular environment requires high metabolic activity of these parasites, just as with the axenic amastigotes. Secondly, the two studies demonstrated that amastigotes of *L. (L.) mexicana* express a greater amount of basic protein than the promastigotes, which can function as an attempt to buffer the protons released into the phagolysosome and neutralize the total charge of this environment (Paape et al. 2008, 2010).

Recently, a study used intracellular amastigotes of three different *L. (L.) donovani* clones and the isobaric tagging method iTRAQ to analyze changes in the protein expression during the differentiation of the parasite (Biyani and Madhubala 2012). Most of the results described by this study agreed with those presented by Rosenzweig et al. (2008a) that used axenic amastigotes of *L. (L.) donovani*. For example, enzymes involved in gluconeogenesis, mitochondrial respiration and stress response were up-regulated in both intracellular and axenic amastigotes. However, the up-regulation of proteins associated with the traffic of vesicles in amastigotes such as “putative Rab7” and “GTP binding protein” is a new finding of this study. The increase in the vesicular transport may be important for the survival of the parasite inside the phagolysosomes being necessary for nutrient acquisition and release of metabolites and virulence factors (Biyani and Madhubala 2012).

The first simultaneous comparison between axenic and intracellular amastigotes of *L. (L.) donovani* demonstrated that both share more than 93 % of the protein profile (Pescher et al. 2011). Of 2,152 proteins detected through 2D-DIGE analysis, 152 were differentially expressed in axenic and intracellular amastigotes (Pescher et al. 2011). Nevertheless, the same study reported that axenic amastigotes showed a significant increase in both cell size and nuclear diameter when compared with intracellular amastigotes. Also, axenic amastigotes demonstrated a drastic reduction in the capacity of infecting the host and surviving in the intracellular environment (Pescher et al. 2011). Thus, the differences in cell size and infectivity observed between axenic and intracellular amastigotes are linked to a minor set of differentially expressed proteins with increased abundance in axenic amastigotes (113 spots) or splenic amastigotes (39 spots). In fact, proteins such as “tryparedoxin peroxidase” and “methylthioadenosine phosphatase”, required for anti-oxidant resistance and growth under nutritionally deprived conditions, were up-regulated in intracellular amastigotes (Pescher et al. 2011).

Many studies have used *Leishmania* procyclic promastigotes as a model due to the ease of cultivation *in vitro*. Nevertheless, the metacyclic promastigotes are the infective form to the vertebrate host, while the amastigotes are responsible for the pathogenesis of the disease. As shown above, many metabolic pathways are regulated differentially in these developmental stages, and different proteins could be targeted for therapeutic development. However, there are still many gaps in the knowledge on this topic, especially with regard to parasites belonging to the *L. (Viannia)* subgenus. In this context, quantitative proteomic approaches applied to the analysis of the protein profile from metacyclic promastigotes and intracellular amastigotes is a promising field for the discovery of new virulence markers.

3 The Importance of Post-Translational Modifications (PTMs) for *Leishmania* Differentiation

Leishmania spp. undergoes drastic biological changes during its life cycle, but only a small fraction of its genes is differentially regulated between promastigotes and amastigotes (Bente et al. 2003; Nugent et al. 2004; Foucher et al. 2006; Leifso et al. 2007; Rosenzweig et al. 2008a). Post-transcriptional and post-translational controls, including the mRNA stability, translation initiation and protein folding are the major mechanisms of gene regulation in *Leishmania*, contributing for the increase in the complexity from genome to proteome level (Fasel et al. 2008). The complexity of proteome is further increased by PTMs, chemical modifications that can determine protein structure, cellular localization, activity state and interactions with other proteins, cells or organisms (Fasel et al. 2008; Wastling et al. 2012). Although many studies have reported qualitative and quantitative changes in the protein profiles of promastigotes and amastigotes, little is known about the role played by PTMs during *Leishmania* differentiation. Rosenzweig et al. (2008b) used a quantitative approach based on iTRAQ and LC-MS/MS to elaborate the first high-throughput analysis of PTMs during *L. (L.) donovani* differentiation. A total of 16 phosphorylated, 20 methylated, 26 acetylated, 9 hexosylated and 4 fucosylated distinct peptide modifications were detected. In the same way that alterations in the abundance of proteins (Rosenzweig et al. 2008a), most significant changes in the PTMs mentioned above occurred during later differentiation times, after promastigotes had initiated their morphological transition into amastigotes (Rosenzweig et al. 2008b).

A further analysis of *L. (L.) donovani* promastigote and amastigote protein extracts used iMAC, 2DE, Pro-Q-Diamond staining and MALDI-MS/MS to detect phosphorylated peptides. In total, 221 spots were identified, of which 48 % had not yet been reported in studies that analyzed the protein profile of total extracts (Morales et al. 2008). Treatment of the phosphoprotein enriched fractions with λ -PPase (an enzyme that cleaves phosphorylated serine, threonine and histidine) drastically reduced the number of spots revealed by Pro-Q-Diamond staining, validating the specificity of iMAC pre-fractionation. This treatment also confirmed

that the protein isoforms with distinct experimental pI and molecular weight detected in the 2D gels resulted from multiple phosphorylations. Although some proteins such as cyclophilin 40 and MAP kinase homolog LmaMPK10 were differentially regulated by promastigotes and amastigotes, most of the *L. (L.) donovani* phosphoproteome was considered to be constitutively expressed. However, the authors noted that high molecular weight phosphoproteins or phosphoproteins associated with membrane or nucleus were possibly underrepresented by 2DE analysis (Morales et al. 2008). Indeed, in a further study by the same group, quantitative analysis by 2D-DIGE revealed 318 spots differentially expressed by promastigotes and amastigotes, which represented 38 % of the phosphoproteins detected. Interestingly, amastigote phosphoproteins with increased abundance were almost exclusively protein chaperones, including several isoforms of HSP90 and HSP70, stress induced protein STI1 and cyclophilin 40. According to Pathway Architect™ software analysis, these chaperones play an important role on signal transduction as they assemble in multimeric complexes and get phosphorylated during interaction with ribosomal client proteins in an amastigote specific manner (Morales et al. 2010).

To extend the coverage of *Leishmania* amastigote phosphoproteome, total protein extract was enriched with iMAC and analyzed by LC-MS/MS. In two biological repeats, 445 phosphorylated proteins were identified, of which 48 % were annotated as hypothetical proteins (Hem et al. 2010). Based on *Saccharomyces cerevisiae* orthologs, proteins responsible for biological functions such as (i) stress response, (ii) translation initiation, (iii) catabolic processes and (iv) protein transport were enriched in Gene Ontology analysis. Physical proof of phosphorylations was provided by the enrichment of phosphopeptides on titanium dioxide columns and subsequent analysis by 2D-LC-MS/MS. A total of 181 phosphorylation sites were detected in 126 proteins. Phosphorylation occurred mostly on serine residues (86 %), but threonine (12 %) and tyrosine (2 %) residues were also modified (Hem et al. 2010). According to gene database annotation, the identified phosphoproteins were gathered into four different categories including: (i) signal transduction (covering protein phosphatases and kinases), (ii) protein folding (including protein chaperones), (iii) transcription/translation (covering translation initiation factors and RNA helicases), and (iv) RNA/protein turnover (including proteins with peptidase and nuclease activity). Also, the identification of amastigote specific phosphorylated chaperones support the results previously obtained by 2D-DIGE analysis, indicating the importance of chaperone phosphorylation for *Leishmania* infectivity and showing that stress response is an important target for drug development (Hem et al. 2010).

4 Proteome of *Leishmania* Cell Fractions

Due to its high hydrophobicity and low solubility, proteins from the plasma membrane are generally underrepresented in proteomic screens. Recently, a new protocol combined sonication, serial centrifugation and free-flow zone electrophoresis (a liquid-based method that separate charged particles according to their isoelectric points) for the

enrichment of *L. (L.) infantum* plasma membrane proteins prior to the separation by 1DE and the analysis by mass spectrometry (Brotherton et al. 2012). Interestingly, 52 % of the membrane enriched proteins were identified for the first time when compared with a previous *L. (L.) donovani* large scale proteomic screen (Rosenzweig et al. 2008a). For promastigotes and amastigotes, this protocol allowed the detection of 260 proteins containing at least one transmembrane domain according to the TMHMM v2.0 software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Brotherton et al. 2012). These proteins were assigned into several functional categories such as transport, metabolism, transcription, translation, surface, protein folding and proteolysis. The enrichment of membrane fractions was confirmed by fluorescence microscopy of the promastigotes expressing the folate biopterin transporter fused with GFP. Total proteins and membrane fractions from GFP-tagged parasites were also blotted against the proteins elongation factor 1 α and α -tubulin to exclude cytosolic and cytoskeletal localization (Brotherton et al. 2012). Another efficient protocol for the enrichment of plasma membrane proteins, based on high speed centrifugation and extraction by octyl glucoside, enabled the identification of proteins differentially expressed by *L. (L.) chagasi* (syn *L. (L.) infantum*) during the metacyclogenesis (Yao et al. 2010). After digestion of the proteins and LC-MS/MS analysis, 93 proteins were detected of which 36 and 58 were specific to the membrane fractions of metacyclic and logarithmic promastigotes, respectively. Metabolic enzymes and transporters of both nutrient and protons were uniquely present in the membrane fractions of the logarithmic promastigotes while known virulence factors such as GP63 and GP46 were detected exclusively in the membranes of the metacyclic parasites (Yao et al. 2010). As the metacyclic promastigotes do not expend energy to undergo cell division, these findings are consistent with the general decrease of the protein synthesis previously reported for this infective stage. In these studies, detergent extraction was a successful tool for the enrichment of membrane fractions, as it allowed the identification of proteins that had not yet been detected in the whole promastigote extracts (Brotherton et al. 2012; Yao et al. 2010; Nugent et al. 2004; Mojtahedi et al. 2008).

Leishmania intracellular material has also been enriched by the use of digitonin, a non-ionic detergent that permeabilizes membranes in a selective way, according to their different concentrations of sterol. While the sterol-rich plasma membrane is affected by 100 μ M of digitonin, the sterol-poor membranes of the organelles are permeabilized by higher concentrations of the detergent, ranging from 0.5 mM to 5 mM. Serial digitonin extractions resulted in five different fractions of proteins, which were separated by 2DE and analyzed by mass spectrometry. Almost no overlap in spot pattern was observed between the gels, demonstrating the efficacy of the fractionation method (Foucher et al. 2006). Also, 153 protein spots were identified, of which 70 % had not yet been detected in previous analyzes. The sub-cellular localization of the protein spots was accessed by blast against the Human Protein Reference Database (<http://www.hprd.org/>). Proteins were also investigated for their putative mitochondrial localization by using the MitoProt II software (Claros and Vincens 1996). Most of the identified proteins were found in cytosol and in mitochondria, but the pre-fractionation also allowed the detection of proteins from endoplasmic reticulum, nucleus and glycosome. In total, 47 hypothetical

Table 14.2 Proteins most commonly associated with plasma membrane, microsomal fraction and secretion of *Leishmania* spp according to proteomic approaches

Proteins from plasma membrane	<i>Leishmania</i> species	References
GP63	<i>L.(L.) infantum</i>	Yao et al. 2010
GP46	<i>L.(L.) infantum</i>	Yao et al. 2010
Proteins from microsomal fraction	<i>Leishmania</i> species	References
GP63	<i>L. (L.) amazonensis</i>	De Oliveira et al. 2006
GP46	<i>L. (L.) amazonensis</i>	De Oliveira et al. 2006
Tryparedoxin peroxidase	<i>L.(L.) major</i>	De Oliveira et al. 2006
GTP-binding rab protein	<i>L. (L.) amazonensis</i>	De Oliveira et al. 2006
Secreted proteins	<i>Leishmania</i> species	References
GP63	<i>L. (L.) donovani</i>	Silverman et al. 2010b
Elongation-Factor 1 β	<i>L. (L.) donovani,</i> <i>L. (V.) braziliensis</i>	Cuervo et al. 2009; Silverman et al. 2010b
KMP-11	<i>L. (L.) donovani</i>	Silverman et al. 2010b
Iron superoxide dismutase homolog	<i>L. (L.) donovani</i>	Silverman et al. 2010b
HSP70	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Cuervo et al. 2009
Tryparedoxin peroxidase	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Cuervo et al. 2009
Activated protein kinase receptor C LACK	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Cuervo et al. 2009
Acid phosphatase	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Cuervo et al. 2009

proteins were identified in this study and their location was confirmed by fluorescence microscopy of GFP-fused proteins detected in both cytosolic and mitochondrial fractions (Foucher et al. 2006).

The microsomal fraction of *Leishmania* was also purified for proteomic analysis. De Oliveira et al. (2006) developed a protocol that combined serial centrifugations and sonication for the detection of proteins associated with transport vesicles. The identification of proteins potentially secreted by the parasite, such as GP63, GP46, tryparedoxin peroxidase and cytosolic nucleoside diphosphate kinase constituted the main findings of this study, indicating that the microsomal fraction is rich in vesicles addressed to the cell membrane for secretion. The GTP binding Rab-protein, involved in the intracellular traffic and localized mainly in the Golgi vesicles was also identified, confirming the efficacy of the protocol. With regard to the detection of abundant proteins from the cytosol (such as HSP60), it was suggested that they may be temporarily associated with the organelles or structures under examination, not necessarily constituting a contamination (De Oliveira et al. 2006). A summary of the major proteins highlighted by the authors in the studies mentioned above is showed in Table 14.2.

5 Secretome

Metabolites, enzymes and virulence factors released by pathogens can interfere in cell signaling and modulate the host immune response. For this reason, proteins secreted by distinct protozoan parasites have been considered key factors for the

establishment of infection and the further development of pathogenesis. The first analysis of *L. (L.) donovani* secretome used a quantitative approach based on stable isotopic labeling of amino acids in culture (SILAC) to differentiate the proteins actively secreted from those associated with the cell body of the parasite (Silverman et al. 2008). Since presence of degradation products and contamination with proteins from the serum are two major problems related to the study of secreted proteins, assays were performed in serum-free conditioned medium containing a nontoxic peptidase inhibitor. The analysis by LC-MS/MS identified 358 proteins in the conditioned medium and, based on quantitative SILAC labeling, 151 were considered to be actively secreted by the parasites. In the same study, a screen against the *Leishmania* genome database revealed that 217 proteins were predicted to have a classical amino-terminal secretion signal peptide. However, only two proteins identified in the conditioned medium contained this signal peptide. On the other hand, 10 % of the proteins identified by LC-MS/MS were previously detected in exosome-like vesicles released from other eukaryotic cells, indicating that *Leishmania* could utilize nonclassical secretion pathways to regulate the liberation of the secreted proteins (Silverman et al. 2008). To investigate this possibility, the exosomes from promastigotes of *L. (L.) donovani* were isolated through high speed centrifugations in different conditions of pH and temperature (Silverman et al. 2010a). Subsequent analysis of the exosomal global proteome by LC-MS/MS detected 329 proteins, 52 % of them shared with the total secretome of *L. (L.) donovani* confirming that exosomes transport much of the material secreted by the parasite (Silverman et al. 2008; 2010a). It was also observed that *L. (L.) donovani* exosomes interact with human monocytes *in vitro*, modulating the release of cytokines. The anti-inflammatory nature of the modulation, characterized by increased IL-10 production, suggested that the exosomal cargo contributed to the establishment of infection (Silverman et al. 2010b). In this sense, the presence of immunogenic proteins in *Leishmania* secretion was investigated by MALDI and LC-MS/MS through the comparison between wild type and mutant HSP100^{-/-} parasites. In previous studies, HSP100^{-/-} *L. (L.) donovani* showed reduced ability to infect macrophages *in vitro*. Similarly, exosomes from HSP100^{-/-} parasites did not express proteins known as virulence factors. In turn, GP63, elongation factor 1 β , kinetoplast membrane protein 11 and a putative homolog of iron superoxide dismutase were some of the immunogenic proteins detected in exosomes from wild type parasites (Silverman et al. 2010b).

In a previous study, Cuervo and colleagues (2009) used 2DE and MALDI-MS/MS to characterize the profile of proteins secreted by promastigotes of *L. (V.) braziliensis* in conditioned medium. In total, 270 spots were detected of which 42 were identified and organized into categories according to GO and KEGG Ontology (<http://www.genome.jp/kegg/genes.html>) annotation of biological processes. The SignalP 3.0 and Secretome P 2.0 servers were used to investigate whether identified proteins had the amino-terminal secretion signal peptide (Bendtsen et al. 2004a, b). According to these analyzes, 62 % of the proteins identified were predicted to be secreted, and among them 5 % were predicted to contain the secretion signal peptide. On other hand, 57 % of the secreted proteins were released from cells by

non-classical secretion mechanisms observed in both eukaryotic and prokaryotic organisms. The promastigote forms of *L. (V.) braziliensis* also secreted proteins involved with signal transduction, intracellular survival and modulation of the host immune response. In this sense, the authors highlighted the roles of HSP70, acid phosphatase, elongation factor 1 β , trypanothione peroxidase and activated protein kinase C receptor LACK, proteins which take part on protein folding, cell cycle regulation and resistance to the oxidative burst, respectively (Cuervo et al. 2009). These results are in agreement with those proposed by Silverman et al. (2008, 2010a), suggesting that non-conventional secretion mechanisms must be preserved among the distinct species of this parasite. A summary of the major proteins identified and discussed by the authors mentioned above is showed in Table 14.2.

6 Proteomics as a Tool for Mapping Drug Resistance in *Leishmania*

For over 60 years, pentavalent antimonials (SbV) have been used as first line drugs in the treatment of leishmaniasis. However, about 15 years ago, patients unresponsive to the treatment and descriptions of resistant strains started to be reported (Faraut-Gambarelli et al. 1997; Lira et al. 1999; Palacios et al. 2001; Abdo et al. 2003; Rojas et al. 2006; Croft et al. 2006). Currently, drug resistance is a major concern in India and in Nepal, where over 60 % of the patients are unresponsive to treatment with SbV (WHO 2010). For antileishmanial activity, SbV has to be reduced to the trivalent form (SbIII) by either the parasite or the macrophage (Callahan et al. 1997; Ephros et al. 1999; Shaked-Mishan et al. 2001). SbV and the more toxic and active trivalent form can interact with several parasite targets including trypanothione reductase, glutathione synthetase, and enzymes from both fatty acid β -oxidation chain and glycolytic pathway (Berman et al. 1982; Cunningham et al. 1994; Wyllie et al. 2004). Antimonials can also lead *Leishmania* parasites to apoptotic cell death, which is mainly characterized by nuclear DNA fragmentation (Sereno et al. 2001; Sudhandiran and Shaha 2003). With the increasing incidence of resistance to antimonials, second-line drugs such as amphotericin B, pentamidine, paromomycin and the oral drug miltefosine have been used as alternatives for the treatment of Leishmaniasis in various regions (WHO 2010). However, high toxicity, questionable efficacy and cross-resistance are recurrent problems (WHO 2010). In this sense, proteomic analysis of susceptible and resistant parasite strains may contribute for the identification of novel targets, therapeutic development and reversing of the resistant phenotype (Cuervo and De Jesus 2012).

Comparative 2DE analysis of *L. (L.) donovani* isolated from SbIII resistant and susceptible kalaazar patients in India showed that proteins associated with the induction of cell death were differentially expressed by each strain (Vergnes et al. 2007). Heat-shock proteins, which take part on *Leishmania* stress response, were up-regulated in the resistant strain. Indeed, growth inhibition assays showed that promastigotes of the susceptible strain transfected with HSP83 gene were more than

twofold resistant to SbIII. HSP83 transfectants were also cross-resistant to miltefosine, an oral drug used for the treatment of visceral and cutaneous leishmaniasis. In both cases, HSP83-overexpressing parasites were protected against decrease in mitochondrial membrane potential and nuclear DNA fragmentation, suggesting that HSP83 may interact with other proteins to negatively regulate *Leishmania* mitochondria-dependent apoptotic pathway (Vergnes et al. 2007). In the same study, 2DE analysis detected down-regulation of small-kinetoplastid-related-protein (SKRP) in the resistant parasites. This protein is often associated with calpain-like peptidases which are one of the key effectors of programmed cell death in *Leishmania*. As expected, overexpression of SKRP increased the sensitivity of resistant parasites to SbIII and SbV, enhancing DNA fragmentation. However, overexpression of SKRP had the opposite effect on miltefosine treated parasites, protecting them against decrease in mitochondrial membrane potential and nuclear DNA fragmentation (Vergnes et al. 2007). These findings reveal that proteins may have contrasting roles in the resistance mechanisms of *Leishmania*, highlighting the importance of further studies to detect resistance pathways in different species and strains.

Many studies use *Leishmania* promastigotes as a model to study the mechanisms of drug resistance. In order to check whether similar mechanisms are observed in amastigotes, El Fadili et al. (2009) selected SbIII resistant *L. (L.) infantum* by direct drug pressure under axenic conditions. Comparative analysis between resistant and susceptible amastigotes by 2DE revealed several down-regulated proteins in the resistant strain such as: LACK receptor, β -tubulin, proteasome 26 subunit, pyruvate kinase and the kinetoplastid membrane protein 11 (KMP-11). The authors gave special attention to KMP-11, which was associated with SbIII resistance for the first time (El Fadili et al. 2009). Previous studies have suggested that KMP-11 is an amphipatic membrane protein involved with the increase of the lipid bilayer pressure (Jardim et al. 1995; Fuertes et al. 1999). In this sense, a reduction in KMP-11 expression could change SbIII interaction with transporters such as aquaglyceroporin, which is known to facilitate the uptake of trivalent metalloids (Gourbal et al. 2004). Down-regulation of KMP-11 could also alter the interaction of SbIII with efflux systems increasing drug transport out of the parasites (El Fadili et al. 2009). Western-blot analysis using a monoclonal antibody specific for KMP-11 confirmed down-regulation of this protein in the SbIII resistant strain. However, northern-blot revealed that down-regulation was not correlated with a decrease in the mRNA levels (El Fadili et al. 2009). Indeed, N-terminal acetylation of KMP-11 indicates that the protein stability may be compromised in the SbIII resistant strain, which could increase KMP-11 degradation rate in this condition (Rosenzweig et al. 2008a, b).

Two studies published by the same group investigated proteins differentially expressed by *L. (L.) donovani* strains resistant to SbIII and paromomycin. In the first study, a comparative analysis between SbIII susceptible and resistant parasites was conducted through a quantitative approach based on iTRAQ and LC-MS/MS (Biyani et al. 2011). In the second study, proteins differentially expressed by paromomycin resistant and susceptible strains were detected by SILAC labeling and LC-MS/MS (Chawla et al. 2011). Despite the use of different labeling methods,

up or down regulation of proteins involved with (i) metabolism, (ii) stress response, (iii) processing of DNA and RNA, (iv) protein translation, (v) intracellular survival, and (vi) cytoskeleton were common to both SbIII and paromomycin resistant parasites. Within the biological function “metabolism”, the increase in the expression of enzymes involved with glycolysis was the more noticeable. Interestingly, it has been demonstrated that pyruvate acts as a peroxide scavenger in mammalian cells (Wang et al. 2007; Babich et al. 2009). Thus, it is suggested that up-regulation of enzymes from the glycolytic pathway can provide resistant *Leishmania* strains an extra protection against oxidative stress (Biyani et al. 2011). Up-regulation of heat shock proteins also play an important role on the protection of resistant parasites against oxidative stress and apoptotic cell death (Vergnes et al. 2007; Biyani et al. 2011; Chawla et al. 2011). Regarding the mechanism of action of paromomycin, proteomic analysis by SILAC and LC-MS/MS showed that proteins related to vesicular trafficking and fusion had an increased expression in the resistant strain. Additionally, transmission electron microscopy of resistant parasites showed an increase in the number of vesicular vacuoles in the cytoplasm when compared with the wild-type strain (Chawla et al. 2011). Proteomic analysis also revealed that ribosomal proteins involved in the translational machinery had increased expression in the resistant strain. It was suggested that after entering the cell paromomycin acts by inhibiting protein synthesis (Chawla et al. 2011). Thus, the increased expression of proteins related to the translation machinery in the resistant strain could represent a compensatory mechanism for the action of the compound (Chawla et al. 2011). Indeed, this suggestion agrees with results previously observed with *Escherichia coli* which indicate that protein synthesis is inhibited when paromomycin interacts with the ribosomal subunits (Davis 1987).

Recently, Walker et al. (2012) used NP-40 and Triton X-114 detergents to enrich membrane proteins from both SbIII resistant and susceptible *L. (V.) panamensis*. After 2DE separation and LC-MS/MS analysis, several spots were detected but only nine proteins were differentially expressed between resistant and susceptible strains. It is suggested that rather than being involved with a specific resistance mechanism HSP70 related protein-1, HSP70 and stress-induced protein 1 may be associated with general response to stress. On the other hand, GTP-binding protein and ATPase β -subunit may be associated with metal-thiol efflux while elongation factor-2 and translation release factor take part on the modulation of protein synthesis, demanded for the maintenance of the resistant phenotype. Finally, up-regulation of S-adenosylmethionine synthetase and S-adenosylhomocysteine may be involved with the synthesis of glutathione and trypanothione precursors in the resistant strain, playing an essential role in the process of antimony detoxification (Walker et al. 2012). A summary of the major proteins highlighted by the authors in the studies mentioned above is showed in Table 14.3.

Proteomic analysis identified many proteins directly and indirectly related to the development of resistant phenotypes in *Leishmania*. Some of them, such as heat-shock proteins and enzymes from the glycolytic pathway, are up-regulated in strains resistant to antimonials, miltefosine and paromomycin and could be exploited for reversing resistance to all three compounds (Vergnes et al. 2007; Biyani et al. 2011;

Table 14.3 *Leishmania* spp. proteins most commonly associated to drug resistance and/or considered immunogenic antigens according to proteomic approaches. Ant: antimonials; Milt: Miltefosine; Par: paromomycin

Protein name	Associated with resistance to				<i>Leishmania</i> species	References
	Ant	Milt	Par	Immunogenic		
HSP83	X	X	X	X	<i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) infantum</i>	Gupta et al. 2007, Vergnes et al. 2007, Biyani et al. 2011, Chawla et al. 2011, Costa et al. 2011
HSP70	X		X	X	<i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (V.) panamensis</i>	Dea-Ayuela et al. 2006, Gupta et al. 2007, Biyani et al. 2011, Chawla et al. 2011, Coelho et al. 2011, Walker et al. 2012
Elongation Factor 2			X	X	<i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (V.) panamensis</i>	Forgber et al. 2006, Gupta et al. 2007, Chawla et al. 2011, Walker et al. 2012
Triosephosphate isomerase	X		X	X	<i>L. (L.) donovani</i>	Gupta et al. 2007, Biyani et al. 2011, Chawla et al. 2011
Enolase			X	X	<i>L. (L.) donovani</i>	Forgber et al. 2006, Gupta et al. 2007, Chawla et al. 2011
Manose-1-phosphate guanylyl-transferase	X			X	<i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) infantum</i>	Biyani et al. 2011, Costa et al. 2011
Aldose-1-epimerase	X			X	<i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) infantum</i>	Biyani et al. 2011, Costa et al. 2011
3,2-trans-enoyl-Co-A isomerase			X	X	<i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) infantum</i>	Chawla et al. 2011, Costa et al. 2011
Calreticulin				X	<i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) infantum</i>	Gupta et al. 2007, Coelho et al. 2011
ATP-dependent RNA-helicase			X	X	<i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) infantum</i>	Chawla et al. 2011, Coelho et al. 2011
KMP-11	X			X	<i>L. (L.) donovani</i>	El Fadili et al. 2009, Costa et al. 2011

Chawla et al. 2011). However, drug resistance is a multifactorial problem that involves *Leishmania* genetic diversity, host immune response and host genetic background (Cuervo and De Jesus 2012). In this sense, genome sequencing of other *Leishmania* species and quantitative proteomics studies involving a larger number of them may reveal novel proteins associated with the development of resistance phenotypes.

7 Proteomic Analysis of *Leishmania* Antigens and Vaccine Candidates

Visceral leishmaniasis is a major parasitic disease in Asia, Africa and South America affecting about 0.2 to 0.4 million people every year (Murray et al. 2005; Alvar et al. 2012). As mentioned above, resistance to antimonials in India and Nepal hampers disease control. Furthermore, the available anti-leishmanial drugs are highly toxic leading patients to drop out the treatment, especially in cases of co-infection with HIV and association with malnutrition (Murray et al. 2005; WHO 2010). For these reasons, pioneering studies analyzed the proteomes of promastigotes of *L. (L.) donovani* and *L. (L.) infantum* in search of disease-specific biomarkers and new therapeutic targets. Using ammonium sulfate precipitation and SDS-PAGE separation Garg et al. (2006) obtained a fraction of proteins from *L. (L.) donovani* which showed significant Th1 responses in cured patients and hamsters. Characterization of this fraction by 2DE and MALDI-MS/MS revealed proteins, such as disulfide isomerase, enolase and triosephosphate isomerase, which were previously identified as immunogenic in other organisms and may also represent potential therapeutic targets against *Leishmania* (Gupta et al. 2007). Further characterization of that fraction, allowed the identification of calreticulin, a protein involved with glycoprotein folding and considered a therapeutic candidate as it may affect the targeting of proteins associated with the virulence of the parasite (Gupta et al. 2007).

In order to investigate the heterogeneity of the *L. (L.) donovani* responses, sera of four patients from Bihar (India) were collected for analysis by 2DE-Western blot (Forgber et al. 2006). In this assay, the parasites used as a source of antigens were isolated from two patients that lived in adjacent districts of Bihar. In total, 330 different antigens were detected, of which 68 were related to proteins in 2DE gels. Some antigens were shared between the two parasite isolates, but extensive differences were observed in the patterns of the spots and no immunodominant antigens could be detected (Forgber et al. 2006). The reactivities were found to be weaker when both parasites and sera were isolated from the same patient, indicating that the immune system may use selection processes that increase tolerance to some antigens (Forgber et al. 2006). It was also observed that antigenicity of the proteins did not correlate with their expression level in 2DE gels. Six protein spots which correlated with Western blot signals were analyzed by MALDI-MS/MS and five antigens were identified, among them, HSP70 and elongation factor 2, which were previously reported as being immunogenic proteins (Forgber et al. 2006; Gupta et al. 2007). A similar study using rabbit hyperimmune serum raised against promastigote

extracts also combined 2DE with Western blot analysis to investigate antigenic proteins of *L. (L.) infantum*. In this study, MALDI-MS/MS identified several antigenic proteins such as ATPase β subunit, transketolase, proteasome subunit, succinyl-diaminopimelate desuccinylase, tubulin α chain, HSP70 and several hypothetical proteins with unknown function (Dea-Ayuela et al. 2006).

Dogs are important targets for the control of *Leishmania* transmission in places where visceral leishmaniasis is a zoonosis (WHO 2010). Currently, there are three vaccines licensed for prophylaxis of non-infected dogs against canine visceral leishmaniasis. Fucose-mannose-ligand-saponin vaccine is commercialized under the name of Leishimune® in Brazil (da Silva et al. 2001; Santos et al. 2007). Leish-Tec®, a vaccine composed of recombinant A2 antigen of *Leishmania* amastigotes and adjuvanted by saponin, is also commercialized in Brazil (Fernandes et al. 2008). Finally, CaniLeish®, a vaccine composed of proteins secreted by *L. (L.) infantum*, was licensed for commercialization in Portugal, Spain, France, Greece and Italy (Lemesre et al. 2005, 2007; Bourdoiseau et al. 2009). Although these three vaccines are available for immunization of dogs against visceral leishmaniasis, proteomic studies still contribute for the identification of new immunogenic *Leishmania* antigens. Recently, Costa et al. (2011) used an immunoproteomic approach to identify *Leishmania* antigens that are immunogenic for dogs. In this study, proteomic analysis was performed with a highly virulent strain of *L. (L.) chagasi* (syn *L. (L.) infantum*) isolated from a dog in Brazil. Briefly, whole promastigote extracts were separated by 2DE, transferred by Western blot and incubated with a pool of sera from dogs infected with various stages of visceral leishmaniasis. MALDI-MS/MS analysis identified 41 proteins, of which 3 and 38 were reactive with IgM and total IgG respectively (Costa et al. 2011). The identification of antigens was followed by *in silico* analysis to predict B cell epitopes. Mannose-1-phosphate guanyltrifosforiltransferase, α -tubulin and HSP83 were recognized by IgM in sera from acutely infected dogs, but only HSP83 had a B cell epitope recognized in its structure. In turn, eight proteins (HSP83, 3,2-trans-enoyl Co-A isomerase, ribonucleoprotein p 18 mitochondrial precursor, aldose 1-epimerase and four hypothetical proteins) were recognized by IgG in sera from chronically infected animals and all of them were predicted to have B cell epitopes. Bioinformatic methods were also applied to identify immunogenic proteins with T cell epitopes. Interestingly, four proteins identified specifically in the amastigote form of *L. (L.) infantum* by 2D-DIGE presented high content of T cell epitopes and were selected as antigens with greater potential to be immunogenic for T cells and vaccine development (Costa et al. 2011). As *Leishmania* amastigotes are responsible for causing the clinical manifestations of leishmaniasis in mammals, the mapping of antigens specific from this stage has great importance. Coelho et al. (2012) used a pool of symptomatic and asymptomatic dogs' sera to perform immunoblots against promastigotes and axenic amastigotes of *L. (L.) infantum*. Separation of proteins by 2DE detected 350 protein spots in promastigote and 200 spots in amastigote total extracts. (Coelho et al. 2012). Spots which reacted with sera from symptomatic or asymptomatic dogs were analyzed by MALDI-MS/MS and several proteins were identified. Most of them were expressed by both *Leishmania* stages and reacted with sera from symptomatic dogs, including proteins involved

with stress response, carbohydrate metabolism, protein synthesis and some known virulence factors such as KMP-11 (Coelho et al. 2012). Three proteins (ATP-dependent RNA helicase, A2, and amastin) were detected exclusively in axenic amastigotes and may constitute important therapeutic targets. Finally, several proteins proved to be reactive against sera of asymptomatic dogs. Despite the fact of being potential diagnostic antigens, proteins expressed by dogs which can control parasite replication may be correlated with protective responses and thus represent potential vaccine candidates (Coelho et al. 2012).

8 Concluding Remarks

As reviewed above, proteomic approaches are particularly useful tools for the identification of proteins and mechanisms involved in several aspects of the biology of *Leishmania* parasites. A summary of the proteins highlighted by the authors in such studies was presented in Tables 14.1, 14.2, and 14.3. New roles for already well-characterized proteins as well as the assignment of roles for proteins of unknown function are being defined for several *Leishmania* species using those proteomics tools. However, the recurrent identification of a group of proteins that correspond to the most abundant ones (both in *Leishmania* and in several biological systems) precludes the identification of the less abundant proteins and obscures the studied phenomena (Gygi et al. 2000; Petrak et al. 2008). For this reason, new proteomics technologies together with specific bioinformatic tools and databases may be valuable for a better exploitation and interpretation of the *Leishmania* proteomics and for revealing intra and inter-specific particularities.

References

- Abdo MG, Elamin WM, Khalil EA et al (2003) Antimony-resistant *Leishmania donovani* in eastern Sudan: incidence and *in vitro* correlation. *East Mediterr Health* 9:837–843
- Acestor N, Masina S, Walker J et al (2002) Establishing two-dimensional gels for the analysis of leishmania proteomes. *Proteomics* 7:877–879
- Adaui V, Castillo D, Zimic M et al (2011) Comparative gene expression analysis throughout the life cycle of *Leishmania braziliensis*: diversity of expression profiles among clinical isolates. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1021
- Aebersold R, Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422:198–207
- Altschul SF, Gish W, Miller W et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Alvar J, Vélez ID, Bern C et al (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7:e35671
- Babich H, Liebling EJ, Burger RF, Zuckerbraun HL, Schuck AG (2009) Choice of DMEM, formulated with or without pyruvate, plays an important role in assessing the *in vitro* cytotoxicity of oxidants and prooxidant nutraceuticals. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45:226–233
- Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G et al (2007) Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 389:1017–1031

- Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N et al (2004a) Feature based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 17:349–356
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G et al (2004b) Improved prediction of signal peptides: signal P 3.0. *J Mol Biol* 340:783–795
- Bente M, Harder S, Wiesiqql M et al (2003) Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics* 3:1811–1829
- Berman JD, Chulay JD, Hendricks LD et al (1982) *In vitro* susceptibility of antimony resistant *Leishmania* to alternative drugs. *J Infect Dis* 145:279
- Besteiro S, Williams RAM, Coombs GH et al (2007) Protein turnover and differentiation in leishmania. *Int J Parasitol* 37:1063–1075
- Biyani N, Madhubala R (2012) Quantitative profiling of the promastigotes and the intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* isolates identifies novel proteins having a role in *Leishmania* differentiation and intracellular survival. *Bioch Biophys Acta* 1824:1342–1350
- Biyani N, Singh AK, Mandal S et al (2011) Differential expression of proteins in antimony-susceptible and –resistant isolates of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 179:91–99
- Bourdoiseau G, Hugnet C, Gonçalves RB et al (2009) Effective humoral and cellular immunoprotective response in LIESAP-MDP vaccinated protected dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 128:71–78
- Brobey RK, Mei FC, Cheng X et al (2006) Comparative two-dimensional electrophoresis maps of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* braz. *J Infect Dis* 10:1–6
- Brotherton MA, Racine G, Ouanmeur AA et al (2012) Analysis of membrane-enriched and high molecular weight proteins in *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. *J Proteome Res* 11:3974–3985
- Callahan HL, Portal AC, Devereaux R et al (1997) An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 41:818–822
- Chawla B, Jhingram A, Panigrahi A et al (2011) Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin–susceptible –resistant *Leishmania donovani*. *PLoS One* 6:e26660
- Claros MG, Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241:779–786
- Clayton C (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21:1881–1888
- Coelho VTS, Oliveira JS, Valadares DG et al (2012) Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. *PLoS One* 6:e1430
- Costa MM, Andrade HM, Bartholomeu DC et al (2011) Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference Gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. *J Proteome Res* 10:2172–2184
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19:111–126
- Cuervo P, De Jesus JB (2012) Genetic expression and drug resistance, the role of proteomics. In: A. Ponte-Sucre et al. (eds.), *Drug resistance in Leishmania parasites*, DOI 10.1007/978-3-7091-1125-3_11, Springer-Verlag, Wien
- Cuervo P, De Jesus JB, Junqueira M et al (2007) Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Biochem Parasitol* 154:6–21
- Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia L et al (2009) Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *Proteomics* 73:79–92
- Cuervo P, Domon GB, De Jesus JB (2010) Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J Proteomics* 73:845–867
- Cunningham ML, Zvelebil MJ, Fairlamb AH (1994) Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. *Eur J Biochem* 221:285–295
- da Silva VO, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN et al (2001) A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kalazar in an endemic area of Brazil (São gonçalo do amarante, RN). *Vaccine* 19:1068–1081

- Davis BD (1987) Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev* 51:341–350
- De Oliveira AHC, Ruiz JC, Cruz AK et al (2006) Subproteomic analysis of soluble proteins of the microsomal fraction from two *Leishmania* species. *Comp Biochem Physiol* 1:300–308
- Dea-Ayuela MA, Rama-Iñiguez S, Bólas-Fernández F (2006) Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics* 6:4187–4194
- Deplege DP, Evans KJ, Ivens AC et al (2009) Comparative expression profiling of *Leishmania*: modulation in gene expression between species and in different host genetic backgrounds. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e476
- Domon B, Aebersold R (2006) Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312:212–217
- El Fadili K, Drummelsmith J, Gaétan R et al (2009) Down regulation of KMP-11 in *Leishmania infantum* axenic antimony resistant amastigotes as revealed by a proteomic screen. *Exp Parasitol* 123:51–57
- El Fakhry Y, Oullette M, Papadopoulou B (2002) A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics* 2:1007–1017
- Ephros M, Bitnun A, Shaked P et al (1999) Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 43:278–282
- Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M et al (1997) *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 41:827–830
- Fasel N, Acestor N, Fadili-Kündig, et al. (2008) The *Leishmania* proteome. In: Myler PJ and Fasel N (eds) (Caister Academic Press) *Leishmania* after genome. Norfolk
- Fenn J, Mann M, Meng CK et al (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246:64–71
- Fernandes AP, Costa MM, Coelho EA et al (2008) Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26:5888–5895
- Forgber M, Basu R, Roychoudhury K et al (2006) Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology. *PLoS One* 1:e40
- Foucher AL, Papadopoulou B, Ouellette M (2006) Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of *Leishmania infantum*. *J Proteome Res* 5:1741–1750
- Franke ED, McGreevy PB, Katz SP et al (1985) Growth cycle dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *J Immunol* 134:2713–2718
- Fuertes MA, Berberich C, Lozano RM et al (1999) Folding stability of the kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) from *Leishmania infantum*. *Eur J Biochem* 260:559–567
- Garg R, Gupta SK, Tripathi P et al (2006) *Leishmania donovani*: identification of stimulatory soluble proteins using cured human and hamster lymphocytes for their prophylactic potential against visceral leishmaniasis. *Vaccine* 24:2900–2909
- Góngorra R, Acestor N, Quadroni M et al (2003) Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional electrophoresis polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. *Biomedica* 23:153–160
- Görg A, Drews O, Lück C et al (2009) 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* 30:122–132
- Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H et al (2004) Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* 279:31010–31017
- Gupta SK, Sisodia BS, Sinha S et al (2007) Proteomic approach for identification and characterization of novel immunostimulatory proteins from soluble antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. *Proteomics* 7:816–823
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y et al (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9390–9395
- Haile S, Papadopoulou B (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 10:569–577
- Handman E, Mitchell GF, Goding JW (1981) Identification and characterization of protein antigens of *Leishmania tropica* isolates. *J Immunol* 126:508–512

- Hem S, Gherardini PF, Osorio Y, Fortéa J et al (2010) Identification of *Leishmania*-specific protein phosphorylations sites by LC-ESI-MS/MS and comparative genomic analyses. *Proteomics* 10:3868–3883
- Holzer TR, McMaster WR, Forney JD (2006) Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania Mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 146:198–218
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA et al (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309:436–442
- Jardim A, Funk V, Caprioli RM et al (1995) Isolation and structural characterization of *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein 11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem J* 305:307–313
- Karas M, Hilenkamp F (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 15:2299–2301
- Knuepfer E, Stierhof Y, McKean PG et al (2001) Characterization of a differentially expressed protein that shows an unusual localization to intracellular membranes in *Leishmania major*. *Biochem J* 356:335–344
- Laemli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N et al (2007) Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* 152:35–46
- Lemesre JL, Holzmuller P, Cavaleyra M et al (2005) Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigen of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine* 23:2825–2840
- Lemesre JL, Holzmuller P, Gonçalves RB et al (2007) Long lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LIESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double blind randomized efficacy field trial. *Vaccine* 25:4223–4234
- Lira R, Sundar S, Makharia A et al (1999) Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* 180:564–567
- Matsuidara (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 262:10035–10038
- McNicoll F, Drummel-Smith J, Müller M et al (2006) A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *leishmania infantum*. *Proteomics* 6:3567–3581
- Mojtahedi Z, Clos J, Kamali-Sarvestani E (2008) *Leishmania major*: identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Exp Parasitol* 119:422–429
- Morales MA, Watanabe R, Laurent C et al (2008) Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. *Proteomics* 8:350–363
- Morales MA, Watanabe R, Dacher M et al (2010) Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:8381–8386
- Mottram JC, Frame MJ, Brooks DR et al (1997) The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania Mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage. *J Biol Chem* 272:14285–14293
- Murray HW, Berman JD, Davies CR et al (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366:1561–1577
- Nugent PG, Karsani SA, Wait R et al (2004) Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 136:51–62
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007–4021
- Paape D, Aebischer T (2011) Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. To the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. *J Proteomics* 74:1614–1624
- Paape D, Lippuner C, Schmid M et al (2008) Transgenic, fluorescent *Leishmania mexicana* allow direct analysis of the proteome of intracellular amastigotes. *Mol Cell Proteomics* 7:1688–1701

- Paape D, Barrios-Llerena ME, Le Bihan T et al (2010) Gel free analysis of intracellular *Leishmania Mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 169:108–114
- Palacios R, Osorio LE, Grajales LF et al (2001) Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. *Am J Trop Med Hyg* 64:187–193
- Peacock CS, Seeger K, Harris D et al (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39:839–847
- Pescher P, Blisnick T, Bastin P et al (2011) Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. *Cell Microbiol* 13:978–991
- Petrak J, Ivanek R, Toman O et al (2008) Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 8:1744–1749
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H et al (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 7:581–596
- Rochette A, Raymond F, Ubeda J et al (2008) Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. *BMC Genomics* 29:255
- Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ et al (2011) Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genet Res* 21:2129–2142
- Rojas R, Valderrama L, Valderrama M et al (2006) Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis* 193:1375–1383
- Rosenzweig D, Smith D, Opperdoes F et al (2008a) Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J* 22:590–602
- Rosenzweig D, Smith D, Myler P et al (2008b) Post-translational modifications of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics* 8:1843–1850
- Sacks DL, Perkins PV (1984) Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* 223:1417–1419
- Santos FN, Borja-Cabrera GP, Miyashiro LM et al (2007) Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched leishimune vaccine. *Vaccine* 25:6176–6190
- Saravia NG, Gemmel MA, Nance SL et al (1984) Two-dimensional electrophoresis used to differentiate the causal agents of American tegumentary leishmaniasis. *Clin Chem* 30:2048–2052
- Sereno D, Holzmüller P, Mangot I et al (2001) Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2064–2069
- Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M et al (2001) Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 276:3971–3976
- Silverman JM, Chan SK, Robinson DP et al (2008) Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol* 9:R35
- Silverman JM, Clos J, de Oliveira CC et al (2010a) an exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci* 123:842–852
- Silverman JM, Clos J, Horakova E et al (2010b) *Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocyte and dendritic cells. *J Immunol* 185:5011–5022
- Sudhandiran G, Shaha C (2003) Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis in intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem* 278:25120–25132
- Tanaka K, Ido K, Akita S et al (1988) Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time of flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2:151–153
- Vergnes B, Gourbal B, Girard I et al (2007) A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* 6:88–101
- Walker J, Vasquez JJ, Gomez MA et al (2006) Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 147:64–73

- Walker J, Gongorra R, Vasquez JJ et al (2012) Discovery of factors linked to antimony resistance in *Leishmania panamensis* through differential proteome analysis. *Mol Biochem Parasitol* 183:166–176
- Wang X, Perez E, Liu R, Yan LJ, Mallet RT, Yang SH (2007) Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res* 1132:1–9
- Wastling JM, Armstrong SD, Krishna R et al (2012) Parasites, proteomes and systems: has Descartes' clock run out of time? *Parasitology* 139:1103–1118
- WHO (2010) Control of Leishmaniasis. WHO Technical Report Series 949. Geneva
- Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH (2004) Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 279:39925–39932
- Yao C, Li Y, Donelson JE et al (2010) Proteomic examination of *Leishmania chagasi* plasma membrane proteins: contrast between avirulent and virulent (metacyclic) parasite forms. *Proteomics Clin Appl* 4:4–16