

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas – NUPEB  
Laboratório de Enzimologia e Proteômica - LEP  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Análise proteômica comparativa de *Leishmania (Leishmania) infantum* para identificação de proteínas diferencialmente expressas induzidas pelo modelo de desnutrição proteica murino.

Thalita Lopes Valentim Ostolin

Ouro Preto

2014

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas – NUPEB  
Laboratório de Enzimologia e Proteômica - LEP  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Análise proteômica comparativa de *Leishmania (Leishmania) infantum* para identificação de proteínas diferencialmente expressas induzidas pelo modelo de desnutrição proteica murino.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração – Biologia Molecular e Bioquímica Estrutural.

**Orientador:** Prof. Dr. William de Castro Borges

Ouro Preto

2014

O856a

Ostolin, Thalita Lopes Valentim.

Análise proteômica comparativa de *Leishmania (Leishmania) infantum* para identificação de proteínas diferencialmente expressas induzidas pelo modelo de desnutrição proteica murino. [manuscrito] / Thalita Lopes Valentim Ostolin. - 2014.  
87f.: il., color; grafs.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. William de Castro Borges

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.  
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Desnutrição - teses. 2. Proteômica - teses. 3. Leishmaniose visceral - Teses. I. Borges, William de Castro. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.993.161:612.39

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)



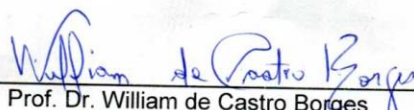
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

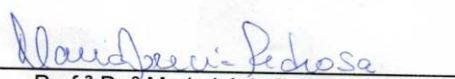
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

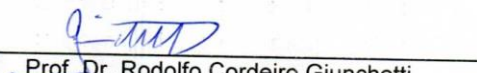
**“Análise proteômica comparativa do proteoma solúvel de *Leishmania (Leishmania) infantum* para identificação de proteínas diferencialmente expressas induzidas pela desnutrição no modelo de leishmaniose murina”**

Aos vinte e oito dias do mês de abril de 2014, às 14:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Thalita Ostolin**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. William de Castro Borges  
Presidente (UFOP)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Pedrosa  
Examinadora (UFOP)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti  
Examinador (UFMG)

DATA DA DEFESA: **28/04/2014**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto  
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil  
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

## **Colaboradores**

Profa. Dra. Simone Aparecida Resende<sup>1</sup>

M.s. Renata Alves de Oliveira e Castro<sup>1</sup>

M.s. Flávia Monteiro Ferreira<sup>1</sup>

I - Laboratório de Pesquisas Clínicas – Cipharma/UFOP

Este trabalho é dedicado à minha família e meus amigos que sempre me fizeram acreditar que era possível.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais e minhas irmãs por sempre me incentivarem e não medirem esforços para que eu estivesse aqui hoje. Amo vocês!

Ao professor William de Castro Borges pela grande oportunidade, orientação, aprendizado e seriedade, que contribuíram para o meu amadurecimento.

A doutoranda Renata Alves de Oliveira e Castro pelo auxílio nos experimentos e total apoio na finalização deste trabalho.

A professora Simone Aparecida Resende pela colaboração neste projeto.

Aos professores Milton Guerra Hércules de Andrade e Marcos Aurélio de Santana pelas contribuições e desenvolvimento de recursos técnicos no LEP.

Ao querido técnico José Henrique Braga Fortes pela experiência dentro do laboratório, por proporcionar um ambiente de trabalho organizado e pelos bons papos.

Aos amigos do LEP, Karina, Gustavo, Leandro, Simone, André, Fernanda e Ananda pelos momentos divertidíssimos e por toda a ajuda. Em especial ao Leandro, por ter me ensinado todas as técnicas dentro do laboratório com muita paciência e atenção.

As minhas queridíssimas amigas Daniela Pala e Natália Reis de Carvalho por me aguentarem esses nove anos, por sempre me apoiarem e por tornarem minha vida muito mais completa. Amo vocês.

Ao amigo João Lino pelas contribuições intelectuais e gastronômicas.

Ao professor Camilo Adalton Silva pela amizade e confiança.

Aos demais amigos que acreditaram que eu venceria esta etapa e, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/NUPEB pela oportunidade do desenvolvimento desta dissertação.

A CAPES/REUNI pela bolsa de estudos fornecida durante a realização deste projeto.

A Universidade Federal de Ouro Preto por, mais uma vez, possibilitar o meu crescimento pessoal e profissional com ensino de qualidade.

*“Quero a certeza dos loucos que brilham.  
Pois, se o louco persistir na sua loucura, acabará sábio.”*

Raul Seixas



## Sumário

|                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Lista de Figuras.....                                                                         | vii |
| Lista de Tabelas e Quadros.....                                                               | ix  |
| Lista de Abreviaturas e Símbolos.....                                                         | x   |
| Resumo.....                                                                                   | xii |
| Abstract.....                                                                                 | xiv |
| 1- Introdução.....                                                                            | 1   |
| 1.1 – Leishmanioses.....                                                                      | 2   |
| 1.2 – Leishmaniose Visceral.....                                                              | 4   |
| 1.3 – Fatores Determinantes para a Leishmaniose Visceral.....                                 | 6   |
| 1.3.1 – Vetor.....                                                                            | 6   |
| 1.3.2 – Parasito.....                                                                         | 7   |
| 1.3.3 – Hospedeiro.....                                                                       | 7   |
| 1.4 – Desnutrição.....                                                                        | 9   |
| 1.4.1 – Desnutrição x Leishmaniose Visceral.....                                              | 12  |
| 1.5 – Abordagem Proteômica.....                                                               | 13  |
| 2 - Objetivos.....                                                                            | 16  |
| 2.1 - Objetivo Geral.....                                                                     | 17  |
| 2.2 – Objetivos Específicos.....                                                              | 17  |
| 3 – Metodologia.....                                                                          | 18  |
| 3.1 – Desenho Experimental.....                                                               | 19  |
| 3.2 – Indução à Desnutrição e Avaliação Nutricional.....                                      | 20  |
| 3.3 – Cultivo de <i>Leishmania infantum</i> e Infecção Experimental.....                      | 21  |
| 3.4 – Avaliação da Carga Parasitária do Fígado e Baço Durante a Fase Crônica da Infecção..... | 21  |

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5 - Cultura e Curva de Crescimento dos Parasitos da Cepa C43 de <i>L. infantum</i> Reisolados de Camundongos Normonutridos e Desnutridos.....                 | 23 |
| 3.6 – Expansão das culturas de <i>L. infantum</i> e Obtenção dos Extratos Proteicos.....                                                                        | 23 |
| 3.7 – Eletroforese Unidimensional e Coloração por Coomassie Coloidal G250.....                                                                                  | 24 |
| 3.8 – Eletroforese Bidimensional.....                                                                                                                           | 25 |
| 3.9 – Análise Imunoproteômica.....                                                                                                                              | 26 |
| 3.10 – Digestão <i>in gel</i> .....                                                                                                                             | 27 |
| 3.11 – Identificação por Espectrometria de Massas.....                                                                                                          | 28 |
| 4 – Resultados.....                                                                                                                                             | 30 |
| 4.1 – Indução à Desnutrição – Acompanhamento do peso, níveis séricos de albumina e proteína.....                                                                | 31 |
| 4.2 – Curva de Crescimento e Quantificação de Parasitos no Baço e Fígado.....                                                                                   | 34 |
| 4.3 - Perfil Proteico dos Parasitos Recuperados dos Camundongos dos Grupos Teste e Controle em Eletroforese Bidimensional (SDS-PAGE) – Análise Comparativa..... | 36 |
| 4.4 – Análise Imunoproteômica do Soro Sanguíneo dos Animais.....                                                                                                | 41 |
| 5 – Discussão.....                                                                                                                                              | 46 |
| 6 – Conclusão.....                                                                                                                                              | 54 |
| 7 – Referências Bibliográficas.....                                                                                                                             | 56 |
| 8 – Anexos.....                                                                                                                                                 | 69 |

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....                                                                                            | 3  |
| Figura 2: Leishmaniose visceral no estado de Bihar, Índia.....                                                                                | 5  |
| Figura 3: Média do peso dos animais a cada semana após a infecção por <i>L. infantum</i> .....                                                | 32 |
| Figura 4: Dosagem de proteína e albumina sérica dos animais antes e depois da infecção.....                                                   | 33 |
| Figura 5: Curva de crescimento <i>in vitro</i> das formas promastigotas recuperadas do fígado dos animais dos grupos teste e controle.....    | 35 |
| Figura 6: Quantificação de parasitos no baço e fígado dos animais após 3 meses de infecção.....                                               | 35 |
| Figura 7: Géis bidimensionais representativos do perfil proteômico de <i>L. infantum</i> recuperados na fase aguda (2 semanas) da doença..... | 37 |
| Figura 8: Géis bidimensionais representativos do perfil proteômico de <i>L. infantum</i> recuperados na fase crônica (3 meses) da doença..... | 39 |
| Figura 9: <i>Immunoblotting</i> unidimensional com extrato dos parasitos recuperados do grupo controle.....                                   | 42 |
| Figura 10: <i>Immunoblotting</i> do soros dos grupos teste e controle.....                                                                    | 43 |
| Figura 11: <i>Immunoblotting</i> do soro do grupo controle.....                                                                               | 44 |
| Figura Suplementar 1.....                                                                                                                     | 70 |
| Figura Suplementar 2.....                                                                                                                     | 71 |

## **Lista de Tabelas e Quadros**

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1: Nutrição e sua correlação com o sistema imunológico.....                                                                                                           | 11 |
| Quadro 2: Composição das dietas.....                                                                                                                                         | 20 |
| Tabela 1: Proteínas diferencialmente expressas nos extratos proteicos dos parasitos recuperados dos grupos controle e desnutrido na fase aguda da leishmaniose visceral..... | 38 |
| Tabela 2: Proteínas diferencialmente expressas nos extratos proteicos dos parasitos recuperados dos grupos teste e controle na fase crônica da leishmaniose visceral.....    | 40 |
| Tabela 3: Proteínas do parasito reativas ao soro do grupo controle, identificadas por espectrometria de massas.....                                                          | 45 |

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

°C - Graus Celsius

% - Percentual

µg - Micrograma

µL - Microlitro

ACN - Acetonitrila

ATP – Adenosina trifosfato

BCIP – *5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*

C - Grupo controle

CCA – Centro de Ciência Animal

CHAPS - *3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1- propanesulfonate*

COX - Ciclooxygenase

CXCR2 – Receptor de quimiocina

D – Grupo desnutrido

DALY - *Disability-Adjusted Life Years*

DAT - teste de aglutinação direta

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DPC – Desnutrição proteico-calórica

DTT- Ditionitrito

ef-1α – fator de alongação 1 alfa

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

GTP – Guanina trifosfato

HCl – Ácido clorídrico

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HSP – Proteína de choque térmico

IEF - Isoeletrofocalização

IFN-γ – Interferon gama

IL-2 – Interleucina 2

IL-4- Interleucina 4

IL-10 – Interleucina 10

kcal - Kilocalorias

kDa - Kilodáton

Kg - Kilograma

**L** – litro  
**LC** – Leishmaniose cutânea  
**LCD** – Leishmaniose cutânea difusa  
**LMC** – Leishmaniose mucocutânea  
**LV** – Leishmaniose Visceral  
**M** - Molar  
**mA** - Miliampere  
**Mb** - Megabase  
**mg** - Miligrama  
**mM** - Milimolar  
**mm** - Milímetro  
**MS** – Ministério da Saúde  
**NaCl** – Cloreto de Sódio  
**NBT** – Nitro-blue tetrazolium chloride  
**PBS** - Phosphate buffered saline  
**PCR** - Reação em cadeia da polimerase  
**pH** - Potencial hidrogeniônico  
**PG** – Prostaglandina  
**PGE2** – Prostaglandina E2  
**PVDF** – Polyvinylidene difluoride  
**RIFI** - Reação de imunofluorescência indireta  
**RPM** – Rotações por minuto  
**SDS** – Dodecil sulfato de sódio  
**SDS-PAGE** - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS  
**TFA** – Ácido tricloroacético  
**TGF- $\beta$**  – Fator transformador de crescimento beta  
**Th1** – Linfócito T auxiliar, subtipo 1  
**Th2** - Linfócito T auxiliar, subtipo 2  
**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa  
**p:v** – Peso/volume  
**v:v** – Volume/volume  
**UFOP** – Universidade Federal de Ouro Preto  
**WHO** - *World Health Organization* - Organização Mundial de Saúde

## Resumo

A leishmaniose é uma doença endêmica em vários países, com incidência anual de 2 milhões de casos. A forma visceral da doença é a mais severa e a falta de tratamento pode levar o indivíduo à morte. Está bem estabelecido que a desnutrição (DPC) constitui fator de risco para a progressão clínica da leishmaniose visceral (LV), porém, pouco se conhece sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos tanto na biologia do parasito quanto na resposta do hospedeiro na ocorrência simultânea de DPC e LV. Assim, o presente trabalho teve como foco a análise do perfil proteômico de *Leishmania (Leishmania) infantum* após a passagem pelo modelo murino de desnutrição proteica. Camundongos do grupo teste receberam dieta contendo 3% de proteína, enquanto os do grupo controle receberam dieta normal, contendo 14%. Após 8 semanas do início da dieta, confirmou-se a desnutrição dos animais do grupo teste a partir dos parâmetros peso corporal e dosagem sérica de proteína total e albumina. Os camundongos de cada grupo foram infectados com promastigotas de *L. infantum*, na mesma dose, e, posteriormente, os parasitos foram recuperados do fígado e baço na 2<sup>a</sup> semana (fase aguda) e na 15<sup>a</sup> semana (fase crônica) pós-infecção. Após a 15<sup>a</sup> semana de infecção crônica, parasitos recuperados de animais de ambos os grupos exibiram curva de crescimento diferencial *in vitro*, sugerindo maior atividade proliferativa de promastigotas isolados de camundongos desnutridos. O estado nutricional também influenciou significativamente no aumento da carga parasitária total do fígado em animais desnutridos. A técnica 2D-PAGE comparativa, para os extratos de *L. infantum* recuperados dos dois grupos, revelou perfis eletroforéticos similares com poucos *spots* únicos de cada extrato. No entanto, promastigotas recuperados de animais em fase crônica da LV e submetidos à desnutrição apresentaram aumento de expressão para proteínas envolvidas com biossíntese proteica. A resposta imune humoral dos animais, frente a antígenos solúveis do parasito, também foi avaliada pela técnica de Western blotting. Essa abordagem imunoproteômica revelou padrões de reatividade distintos para os soros de animais de ambos os grupos. De particular importância, o soro de camundongos desnutridos quando empregado na mesma diluição do soro de camundongos normonutridos, não reconhece

proteínas da família das HSP's e chaperoninas, as quais têm sido descritas como altamente imunogênicas em diversos estudos. Coletivamente, os resultados obtidos demonstraram que a DPC altera o perfil proteômico de *L. infantum*, compromete o estabelecimento de uma resposta humoral eficaz contra proteínas do parasito e está associada ao aumento de carga parasitária no hospedeiro vertebrado.



## Abstract

Leishmaniasis is an endemic disease in many countries with approximately 2 million cases reported annually. The visceral form of the disease is the most severe, and the lack of treatment can lead to death. It has been established that undernutrition constitutes a risk factor for the progression of visceral leishmaniasis (VL). However, little is known about the biochemical mechanisms involved in parasite's biology as well as in the host response when undernutrition and VL occur simultaneously. In this context, the present investigation intended to evaluate the proteomic profile of *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes after passage in mice previously maintained under protein restriction. Mice belonging to the test group received a diet containing 3% protein whilst those from the control were fed a 14% protein diet. After 8 weeks, protein undernutrition was confirmed for test-group animals by monitoring body weight and serum levels of total protein and albumin. Mice from both groups were then inoculated with *L. infantum* promastigotes, at the same dose, and parasites recovered from liver and spleen on the 2<sup>nd</sup> (acute phase) and 15<sup>th</sup> (chronic phase) weeks post-infection. Promastigotes from mice under chronic phase VL exhibited a differential growth curve in vitro, suggesting an increased proliferative activity for parasites isolated from animals of the test group. The nutritional status also significantly increased parasite burden in the liver of test-group animals. A comparative 2D-PAGE technique, using protein extracts of *L. infantum* promastigotes isolated from both groups, revealed similar electrophoretic profiles with few unique spots assigned to each extract. Nevertheless, promastigotes recovered from animals under chronic phase VL and submitted to protein restriction displayed increased expression of molecules involved with protein biosynthesis. The reactivity of whole serum IgG against parasite soluble antigens was also evaluated using the Western blotting technique. This immunoproteomic approach revealed distinct reactivity patterns associated with the sera of animals belonging to the two groups. Of particular importance, sera from test-group animals, when used in the same dilution as sera from control-group animals, did not recognize HSP's and chaperones which have been described as highly immunogenic in various studies. Collectively, our results demonstrated that protein undernutrition alters the

proteomic profile of *L. infantum*, compromises the establishment of an efficient humoral response against promastigote antigens and is associated to increased parasite burden in the vertebrate host.

# 1- Introdução

## 1. Introdução

### 1.1. Leishmanioses

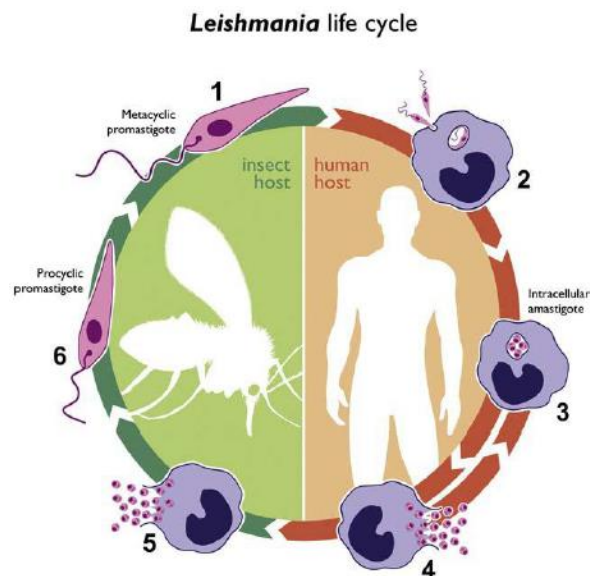
As leishmanioses são causadas por protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903; LAINSON & SHAW, 1979). Os parasitos desse gênero foram divididos em dois subgêneros, de acordo com o local onde se desenvolvem no intestino do vetor: espécies do subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) se desenvolvem no intestino anterior e médio; já a espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* (*Viannia*) se desenvolvem na porção posterior (BATES, 2007). A transmissão do parasito se deve à picada de fêmeas de flebotomíneos, que podem infectar desde o homem a animais silvestres e domésticos, como roedores e cães (DESJEUX, 2004). Vinte espécies de *Leishmania* são patogênicas para seres humanos e, pelo menos 30 espécies de flebotomíneos são vetores comprovados (SEAMAN *et al.*, 1996).

É estimado que, aproximadamente, 350 a 400 milhões de pessoas no mundo encontram-se em risco de contrair as leishmanioses, e 12 a 14 milhões estão infectadas. Por ano, ocorrem 2 milhões de novos casos (1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil casos de leishmaniose visceral) (WHO, 2010).

A doença é considerada endêmica em 88 países, desses, 72 são países em desenvolvimento (WHO, 2005). Entretanto, o impacto das leishmanioses na saúde pública tem sido grosseiramente subestimado. Durante os últimos 10 anos, as áreas de regiões endêmicas expandiram e houve um grande aumento no número de casos registrados da doença. Esse dado é alarmante, uma vez que a notificação da doença é obrigatória em apenas 32 dos 88 países afetados. Além disso, em muitos países, a maioria das ocorrências é de responsabilidade de organizações não-governamentais ou do setor privado, não sendo normalmente incluídas em dados de vigilância, aumentando a subnotificação. De acordo com o índice DALY (*Disability-Adjusted Life Years*), expresso em anos de vida perdidos devido à incapacidade, são perdidos 2 milhões de anos de vida devido às leishmanioses (ANTINORI *et al.*, 2012; BERN *et al.*, 2008; WHO, 2010).

A leishmaniose está intimamente relacionada à pobreza, desnutrição, deslocamento, condições precárias de habitação, sistema imunológico debilitado e falta de recursos. Também está ligada às mudanças ambientais, como o desmatamento, a construção de novas barragens, sistemas de irrigação e urbanização, e a migração de pessoas susceptíveis para áreas endêmicas (ANTINORI *et al.*, 2012; WHO, 2005; GONTIJO & MELO, 2004).

O ciclo de vida do parasito se estabelece entre o trato digestivo do flebotomíneo e os fagolisossomos dos macrófagos do hospedeiro vertebrado. No intestino do inseto, são encontradas as formas promastigotas extracelulares que se replicam até se diferenciarem na forma metacíclica (infectiosa). Já nos fagolisossomos, as promastigotas se transformam em amastigotas intracelulares, fase responsável pela doença, podendo infectar também outras células do sistema fagocítico mononuclear (PETER & SACKS, 2006; CUERVO *et al.*, 2010). A **figura 1** mostra o ciclo de vida de *Leishmania spp.*



**Figura 1: Ciclo de vida de *Leishmania*.** A forma infectiva da *Leishmania*, promastigota metacíclica (1), é transmitida pela picada da fêmea de flebotomíneo infectada durante o repasto sanguíneo. Promastigotas metacíclicas são fagocitadas pelos macrófagos (2). Dentro dos fagolisossomos dos macrófagos, as formas promastigotas se transformam em amastigotas (3) que se multiplicam por divisão binária, lisam os macrófagos e podem infectar outras células fagocíticas mononucleares (4). Durante o repasto sanguíneo, os flebotomos ingerem macrófagos infectados (5); no trato digestório do inseto as formas amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas (forma proliferativa) e migram para a probóscide como formas promastigotas metacíclicas continuando o ciclo (Cuervo *et al.*, 2010).

O amplo espectro de formas clínicas das leishmanioses está estreitamente associado às espécies de *Leishmania* e ao estado imunológico

do paciente (DESJEUX, 2004). No homem, a doença pode ocorrer em quatro formas principais: leishmaniose cutânea (LC), cutânea difusa (LCD), mucocutânea (LMC) e visceral (LV). A LC é caracterizada pelas lesões múltiplas e incapacitantes com cicatrizes desfigurantes; a forma mais grave, a LC recidiva, tem difícil tratamento. A LCD geralmente ocorre em indivíduos com resposta imune deficiente e tem como principais características as lesões disseminadas por toda a pele que se assemelham às de hanseníase e que não cicatrizam espontaneamente. Também conhecida como *espundia*, a LMC provoca extensa destruição na cavidade oral-nasal e faríngea. Essas lesões provocam mutilação da face e grande sofrimento para o paciente, sendo muito comuns em indivíduos imunossuprimidos. Já a LV, também chamada de *kala azar*, é a mais severa forma dentre as leishmanioses e a falta de tratamento pode levar o indivíduo à morte (MURRAY *et al.*, 2005; PISCOPO & MALLIA AZZOPARDI, 2007).

## **1.2. Leishmaniose Visceral**

A LV é uma doença causada por parasitos protozoários constituintes do complexo *Leishmania donovani* o qual inclui três espécies: *L. donovani* e *L. infantum* em países do Velho Mundo, e *L. chagasi* em países do Novo Mundo (LAINSON & SHAW, 1987). A identidade da *L. chagasi* tem sido questionada há algum tempo, e muitos autores têm considerado *L. chagasi* e *L. infantum* como sendo a mesma espécie (MAURICIO *et al.*, 1999).

Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil (MS, 2006). Na década de 80, a LV ocorria principalmente em áreas rurais pobres no nordeste do Brasil. Com a migração maciça dessas populações rurais para as periferias das grandes cidades, a distribuição geográfica da LV no país mudou consideravelmente. Favelas densamente povoadas, degradação do meio ambiente, condições de vida precárias, esgoto e coleta de lixo inadequados e o contato com cães e outros animais infectados fizeram com que a incidência da doença passasse de 1500 casos/ano para mais de 3000 casos/ano nas últimas décadas (COSTA *et al.*, 2005; WERNECK *et al.*, 2007). Atualmente, a LV têm casos registrados em

19 dos 27 estados, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (MS, 2006).

O período de incubação da LV pode variar desde semanas a vários anos. Os pacientes podem apresentar febre, perda de peso e organomegalias que resistem por meses (VAN GRIENSVEN & DIRO, 2012). A esplenomegalia é proeminente; já a hepatomegalia é menos acentuada, a não ser em casos avançados da doença, em que pode evoluir para disfunção hepática, icterícia e ascite (**Figura 2**). Outros distúrbios clínicos podem ser observados, como: linfadenopatias, anemia, trombocitopenia, neutropenia (devido à supressão da medula óssea e o sequestro esplênico); hipergamaglobulinemia, aumento moderado das enzimas do fígado e hipoalbuminemia. Além disso, o paciente ainda apresenta alto risco de contrair infecções oportunistas (como otite, piodermite, infecção do trato urinário e respiratório), que podem evoluir para sepse (HERWALDT *et al.*, 1999; ALVAR *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Leishmaniose visceral no Estado de Bihar, Índia. (A) Indivíduo com hepatoesplenomegalia acentuada e desnutrição. (B) Crianças com aumento do baço ou fígado (MURRAY, 2005).

Medidas profiláticas eficazes são necessárias para o controle da LV em áreas endêmicas. Inseticidas de ação residual e armadilhas para eliminação do vetor, ações ambientais por parte do governo (como a conscientização da população com relação a desmatamentos e queimadas), levantamento e tratamento dos indivíduos doentes, além da eutanásia de cães soropositivos, são importantes para a erradicação da doença (KROEGER, 2007; WHO, 2010; MS, 2006).

### **1.3. Fatores Determinantes para o Desenvolvimento de Leishmaniose Visceral**

#### **1.3.1. Vetor**

A leishmaniose visceral é transmitida, na maioria dos casos, por fêmeas da espécie *Lutzomyia longipalpis*. No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença: *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*. O *Lu. longipalpis* tem distribuição geográfica mais ampla, pois houve adaptação deste vetor aos ambientes urbanos, em periferias de grandes centros, principalmente na Região Sudeste (MS, 2006).

No momento do repasto sanguíneo, os flebotomíneos infectados depositam a saliva na derme do hospedeiro, e injetam as promastigotas e glicoconjugados secretados pelas mesmas. Esses fatores influenciam na resposta imune e podem aumentar a gravidade da infecção (TITUS & RIBEIRO, 1988; ROHOUSOVÁ *et al.*, 2012). O número de parasitos inoculados pelo vetor pode influenciar na evolução da doença. Quanto maior o número de promastigotas, maior a resposta imune do hospedeiro no local da picada, dificultando assim a propagação para os órgãos viscerais (MAIA *et al.*, 2011).

A saliva dos flebotomíneos transmissores da forma visceral, que possui uma vasta gama de substâncias farmacológicas, causa um aumento na vasodilatação, ao contrário da saliva dos vetores que disseminam a forma cutânea, o que pode melhorar o acesso do parasito às vísceras, influenciando no desenvolvimento da doença (WARBURG *et al.*, 1994).

Algumas proteínas da saliva dos flebotomíneos podem apresentar, ainda, papel protetor contra a LV. Em hamsters, a imunização com essas proteínas induziu um aumento da produção de IFN- $\gamma$  no local da picada e diminuição da carga parasitária (GOMES *et al.*, 2008). Indivíduos de uma área endêmica de LV apresentaram uma resposta de anticorpos robusta contra a saliva de *Lu. longipalpis*, que se correlacionou com a resposta imunológica anti-parasito e, 1 ano após a exposição, obtiveram uma redução significativa da infecção (VINHAS *et al.*, 2007). Assim, a saliva do vetor pode aumentar a infecção por *Leishmania* e a vacinação com a mesma pode impedir a progressão da LV.



### 1.3.2 Parasito

As espécies causadoras da LV (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*) são mais adaptadas para sobreviver e proliferar em órgãos viscerais do que as espécies associadas à forma cutânea e são resistentes às temperaturas mais altas. Durante o curso da LV, a febre pode chegar a 40°C e ampliar a resposta imune através do aumento das células dendríticas, a migração de neutrófilos, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a atividade das células Th1, assim como a produção de oxidantes por essas células fagocíticas. Já foi comprovado que *L. donovani* é mais resistente ao óxido nítrico e peróxido de hidrogênio do que *L. major* (SCOTT, 1985; SARKAR *et al.*, 2012).

As diferenças genéticas entre as espécies de *Leishmania* que regem as manifestações clínicas específicas ainda não são completamente elucidadas. Porém, a família do gene A2, expresso em *L. donovani* e *L. infantum*, já é bem caracterizada e está relacionada com a visceralização da doença. A expressão do gene A2 é induzida pela diferenciação da fase promastigota em amastigota, e pode proteger o parasito contra o choque térmico e o *stress* oxidativo. A diminuição da expressão e a inibição parcial desses genes resultaram na diminuição da carga parasitária em camundongos BALB/c, e a introdução desses genes em cepas de *L. major* aumentou a disseminação para os órgãos viscerais (ZHANG *et al.*, 2003; McCALL & MATLASHEWSKI, 2010; CHAREST, 1994).

### 1.3.3 Hospedeiro

O sistema imunológico do hospedeiro é o ponto principal para o desenvolvimento da LV. A proporção de casos assintomáticos para casos sintomáticos é estimada em 18:1, o que demonstra que muitos indivíduos infectados são capazes de desenvolver uma resposta imune eficaz contra o parasito (McCALL *et al.*, 2013). Para o controle da infecção, se faz necessária uma resposta eficiente mediada por Th1 e IFN- $\gamma$ , com a produção de NO, que tem função “leishmanicida”, o que pode impedir a disseminação para os órgãos viscerais (STANLEY & ENGWERDA, 2007; DIEFENBACH *et al.*, 1999). Entretanto, somente a resposta mediada por Th1 e IFN- $\gamma$  não é suficiente para

proteger contra a doença, já que alguns portadores de LV são incapazes de produzir IFN- $\gamma$  em resposta a antígenos de *Leishmania*, e níveis elevados de IL-10 (interleucina imunossupressora) também estão correlacionados a casos sintomáticos (SINGH *et al.*, 2012).

Em meados dos anos 80, houve a propagação global do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e, concomitantemente, houve o surgimento da co-infecção HIV/LV, principalmente dentre os usuários de drogas intravenosas. O risco de desenvolver a doença é dez vezes maior para portadores de HIV comparado a indivíduos não infectados. Espécies que causam a forma cutânea também podem causar a forma visceral em pacientes imunodeprimidos, nesse caso, as manifestações da doença são atípicas, como a presença de lesões cutâneas e parasitemia visceral, simultaneamente. Nesses pacientes, as características clássicas da doença são as mesmas, porém a resposta ao tratamento é menor e a taxa de recidiva chega a 90% para os indivíduos que não recebem a terapia anti-retroviral. Os casos de co-infecção HIV/LV têm aumentado nas regiões da África Sub-Saariana, Índia e América do Sul. No Brasil, aproximadamente 2% dos casos reportados de LV são de co-infecção (ALVAR *et al.*, 1997; KUBAR *et al.*, 1998; ALVAR *et al.*, 2008).

A genética do indivíduo pode influenciar no desenvolvimento da LV, alguns estudos encontraram polimorfismos nos genes correlacionados à resposta imune em populações de áreas endêmicas, como citocinas, quimiocinas e seus receptores (TNF- $\alpha$ , IL-4, TGF- $\beta$ , IL-2, CXCR2), que estão associados a casos sintomáticos e assintomáticos de LV (KARPLUS *et al.*, 2002; MOHAMED *et al.*, 2003; SAKTHIANANDESWAREN *et al.*, 2009; FRADE *et al.*, 2011).

A idade também é um elemento significativo, na maior parte das áreas endêmicas, 80% dos casos registrados de LV ocorrem em crianças com menos de 10 anos. Existe uma tendência de modificação na distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens. A razão da maior susceptibilidade das crianças pode ser explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular muitas vezes agravada pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio. Já é bem definido que a idade do hospedeiro pode influenciar na resistência à infecção por *Leishmania*, porém, os mecanismos

que resultam essas altas incidências de casos clínicos entre crianças ainda são pouco esclarecidos. Além de tais fatores, é importante destacar a nutrição do hospedeiro, que pode influenciar diretamente o sistema imunológico do mesmo (SILVA *et al.*, 2001; PETRELA *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2007; MULLER *et al.*, 2008; MS, 2006; BRAGA *et al.*, 2013).

#### **1.4. Desnutrição**

Entende-se por desnutrição um grupo heterogêneo de distúrbios, caracterizados pela deficiência de macro e micronutrientes. É um sério problema de saúde pública, que muitas vezes coexiste com processos infecciosos e inflamatórios, além de problemas ambientais (HUGHES & KELLY, 2006). Em 2004, estimou-se que 852 milhões de pessoas apresentavam desnutrição, sendo a maioria em países em desenvolvimento. A desnutrição é responsável direta ou indiretamente por 54% das 10,8 milhões de mortes de crianças com idade inferior a 5 anos (WHO, 2005).

O Brasil, desde a década de 70, tem apresentado redução na prevalência de baixo peso entre ambos os sexos, em diferentes fases da vida, e em todas as regiões do país. A melhoria no poder aquisitivo das famílias teve participação de 21,7% na redução da desnutrição em crianças menores de cinco anos, na última década. Porém, a distribuição regional da desnutrição segue a mesma distribuição da pobreza, determinando, ainda com maior intensidade, as desvantagens das regiões Norte e Nordeste. Hoje, sabe-se que o baixo peso para a idade (desnutrição aguda) e a baixa estatura para a idade (desnutrição crônica) afetam, respectivamente, aproximados 1,7 e 7,0% das crianças brasileiras (COUTINHO *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2006; UAUY & MONTEIRO, 2004).

Os indivíduos com desnutrição proteico-calórica (DPC) podem ter sintomas variáveis determinados de acordo com o tipo de desnutrição. A inanição simples (a privação absoluta de alimento) representa a fase final da DPC contínua. Na extremidade oposta, está a privação de proteína que ocorre em indivíduos que consomem quase exclusivamente carboidratos; caracterizada principalmente pela deficiência proteica severa e hipoalbuminemia. A perda de proteínas ininterrupta pode se tornar prejudicial à

vida pelo comprometimento dos músculos cardíacos e sistema respiratório, como também comprometer o sistema imunológico. A limitação das defesas imunológicas torna o indivíduo susceptível a um ciclo vicioso de infecções oportunistas, como diarreia, perda de nutrientes e, finalmente, à morte (MAHAM & ESCOTT-STUMP, 2011; LI *et al.*, 2007).

Por outro lado, uma doença primária pode levar ao aumento do catabolismo e das necessidades nutricionais, estado denominado hipermetabolismo. Esta condição é acompanhada frequentemente por anorexia. A associação destes fatores culmina com um acelerado consumo e perda das reservas nutricionais do organismo, resultando em desnutrição (TENNANT, 1996). No indivíduo doente pode ser observado aumento do catabolismo com redirecionamento das reservas nutricionais para atender a demanda de funções ligadas ao sistema imune e reparação tecidual. Observa-se também menor digestão e assimilação de nutrientes associada a perdas adicionais, representadas por diarreias, hemorragias e transudações (TORRANCE, 1996).

A resposta imune é dependente de replicação celular e da síntese de compostos proteicos ativos. Desta forma, é fortemente afetada pelo estado nutricional, que determina a habilidade metabólica celular e a eficiência com que a célula reage aos estímulos, iniciando e perpetuando o sistema de proteção e auto-reparação orgânicos (CHANDRA *et al.*, 1992). Calorias, aminoácidos, vitaminas A, D, e E, piridoxina, ácido fólico, ferro, zinco, e selênio, são nutrientes para os quais já se estabeleceu a estreita relação existente entre o *status* orgânico e o funcionamento do sistema imune, como exposto no **Quadro 1** (CALDER & JACKSON, 2000; BAINES *et al.*, 2002; SCHAIBLE *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2007; CALDER; 2013).

Como consequências de deficiências nutricionais temos a diminuição de: anticorpos humorais e da superfície de mucosas, da imunidade celular, da capacidade bactericida de fagócitos, da produção de complemento, do número total de linfócitos, do equilíbrio dos subtipos de linfócitos T e dos mecanismos inespecíficos de defesa – que incluem as barreiras anatômicas da pele e mucosas, a microbiota intestinal, as substâncias secretoras como linfocina, suco gástrico e muco, a febre, as alterações endócrinas e o sequestro de ferro sérico e tecidual (Saker, 2004; HUGHES & KELLY, 2006; SCHAIBLE &

KAUFMANN, 2007; BRUNETTO *et al.*, 2007). Assim, os elementos da imunidade adaptativa são afetados pela DPC (CALDER, 2013).

**Quadro 1.** Nutrientes e sua correlação com o sistema imunológico

| <b>Nutriente</b>    | <b>Função no sistema imune</b>                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Aminoácidos</b>  | Ativação dos linfócitos T, B e macrófagos;<br>Expressão gênica e proliferação dos linfócitos;<br>Produção de anticorpos, citocinas e outras substâncias citotóxicas.                                                                                                                      |
| <b>Vitamina A</b>   | Maturação dos neutrófilos;<br>Hipovitaminose altera o balanço das células Th1 e Th2, e diminui atividade das células <i>natural killer</i> .                                                                                                                                              |
| <b>Vitamina D</b>   | Muitas células do sistema imune expressam receptor para vitamina D na membrana citosólica;<br>Induz macrófagos a sintetizarem peptídeos anti-microbianos;<br>Pode gerar efeitos imunossupressivos (inibição da proliferação das células T e citocinas, e de anticorpos pelas células B)   |
| <b>Vitamina E</b>   | Protege a camada lipídica da membrana plasmática;<br>Aumento da resposta Th1 mediada por células, com aumento da proliferação de linfócitos e IL2.                                                                                                                                        |
| <b>Ácido Fólico</b> | É essencial à replicação celular;<br>Sua deficiência está relacionada na redução da formação de anticorpos e replicação de linfócitos.                                                                                                                                                    |
| <b>Piridoxina</b>   | Baixos níveis do micronutriente resultam na diminuição brusca na resposta ao antígeno, tanto humoral quanto celular.                                                                                                                                                                      |
| <b>Zinco</b>        | Está correlacionado com a síntese de DNA, crescimento celular e diferenciação, e nas barreiras antioxidantes, todos importantes para a função imune;<br>Deficiência do mineral diminui a atividade das células <i>natural killer</i> , a produção de IL2, e a proliferação de linfócitos. |
| <b>Ferro</b>        | Tem relação com a proliferação das células T, e a produção de citocinas pelas células Th1;<br>É co-fator de diversas enzimas, como a metaloenzima superóxido dismutase;<br>A deficiência induz atrofia do timo, o que gera grande impacto na imunidade.                                   |
| <b>Selênio</b>      | É co-fator de muitas enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes, como a glutathione peroxidase;<br>A diminuição das reservas está correlacionada com menor atividade das células <i>natural killer</i> .                                                                                |

CHANDRA & MCCOLLUM, 1990; CALDER & JACKSON, 2000; BAINES, 2002; SCHAIBLE, 2007; LI, 2007; CALDER, 2012.

### 1.4.1 Desnutrição x Leishmaniose Visceral

A importância da LV reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas na possibilidade de evoluir para formas graves e letais quando associada à DPC e infecções concomitantes. Já é bem estabelecido que o estado nutricional dos indivíduos, principalmente entre crianças menores de 5 anos, é um fator de risco para a progressão clínica da LV em áreas endêmicas. Diversos estudos verificaram associação entre medidas antropométricas abaixo da normalidade e casos sintomáticos de LV, principalmente com relação à estatura por idade, que é indicativo de desnutrição crônica. Crianças mal nutridas de forma moderada a severa têm 12 vezes mais chances de desenvolver LV do que as normonutridas (BADARÓ *et al.*, 1986; PEARSON *et al.*, 1992; GONTIJO & MELO, 2004).

Entretanto, pode ser questionado se a progressão da LV foi responsável pela DPC, se a doença agravou um estado de DPC pré-existente ou, ainda, se o indivíduo apresenta uma forma mais grave por estar desnutrido ao adquirir a doença (MALAFAIA, 2009). De acordo com Silva *et al.* (2010), foi verificado que, dos 345 casos de LV notificados na região metropolitana de Belo Horizonte/MG, 18% dos indivíduos apresentavam diarreia, 45,9% perda de apetite e 27,6% apresentavam náuseas e vômitos. Esses sintomas podem levar o paciente a um quadro de DPC e tornar a LV grave.

A deficiência de micronutrientes é uma variável importante também correlacionada à evolução das doenças infecto-parasitárias; coexiste com a DPC em um ciclo complexo, especialmente em populações de áreas vulneráveis (TAYLOR & HIGGS, 2000; BHASKARAM, 2002). Actor (1960), em um estudo pioneiro no modelo murino, concluiu que a DPC e a deficiência de vitaminas e minerais, estão associadas a um aumento da susceptibilidade a infecção por espécies causadoras da LV.

Segundo Serafim *et al.* (2010), em camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi* e alimentados com dieta contendo 3% de proteína e deficiente em zinco e ferro, foi possível observar uma diminuição significativa de peso nesses animais e um aumento importante na carga parasitária no fígado e baço, além de uma menor produção de IFN- $\gamma$  comparado ao grupo controle. Em outro estudo, que também avaliou a importância da deficiência de zinco, ferro e

proteína na dieta, os camundongos infectados com *L. donovani* apresentaram níveis elevados de prostaglandina E2 e diminuição de IL-10 e óxido nítrico (ANSTEAD *et al.*, 2001). Os dois estudos demonstraram a resposta imune deficiente do hospedeiro decorrente da deficiência de macro e micronutrientes.

Maciel *et al.* (2008), em um estudo com 149 crianças de uma região endêmica de leishmaniose, correlacionaram estado nutricional, idade, baixo peso ao nascer, medidas antropométricas, histórico de amamentação e níveis de vitamina A com infecção por *L. chagasi*. Os casos sintomáticos estavam relacionados a baixos níveis de vitamina A, baixo peso ao nascer, menores medidas antropométricas e menor tempo de amamentação. A vitamina A, é tida como anti-infectiva, e está associada às respostas Th-1/Th-2, cruciais para resolução de infecções intracelulares (JASON *et al.*, 2002).

Diante do exposto, fica claro o envolvimento entre nutrição, sistema imunológico e LV. Contudo, poucos estudos foram desenvolvidos a fim de se investigar o sinergismo entre DPC e LV especificamente, e alguns mecanismos ainda não são completamente elucidados (MALAFAIA *et al.*, 2009; SERAFIM *et al.*, 2010).

### **1.5. Abordagem Proteômica**

A abordagem genômica foi, até pouco tempo, incomparável no quesito que tange a visão sobre a biologia das células e dos seres vivos, através do sequenciamento do conjunto de genes de um organismo. No entanto, os dados sobre a expressão destes genes não são revelados a partir destas técnicas. Informações sobre abundância dos transcritos e presença efetiva das proteínas nas células são obtidas pelo emprego de ferramentas nas áreas da transcripção e proteômica (SERRUTO & RAPPUOLI, 2006; PAAPE *et al.*, 2011).

A palavra proteoma foi utilizada, primeiramente, para expressar a idéia do conjunto das proteínas de uma célula ou organismo (WILKINS, 1996). A proteômica pode fornecer descrições detalhadas de estrutura, função e controle de sistemas biológicos, pois suas técnicas e tecnologias permitem conhecer as proteínas expressas por determinado organismo e suas diversas propriedades (PATTERSON & AEBERSOLD, 2003). Além disso, possibilita

entender como esses sistemas se tornam disfuncionais na doença, e prever quais intervenções, como drogas e manipulações genéticas, podem ser eficazes (ANDERSON, 2000).

A abordagem proteômica clássica baseia-se, principalmente, na separação de proteínas pela eletroforese em gel bidimensional (2D), a qual separa as proteínas por dois parâmetros independentes: ponto isoelétrico na primeira dimensão e massa molecular na segunda dimensão. Os diferentes *spots* de proteínas obtidos podem ser retirados do gel, digeridos a peptídeos por proteases específicas e, então, identificados usando espectrometria de massas após análise dos espectros em bancos de dados (STEEN & MANN, 2004).

As técnicas de imunoproteômica têm se destacado no estudo de agentes infecciosos. Através da utilização de soros como fonte de anticorpos é possível caracterizar os constituintes imunogênicos de uma preparação proteica, empregando-se basicamente experimentos de *Western blotting* (WILLIAMS *et al.*, 2009; AYALEW *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2010, COELHO *et al.*, 2012).

A análise do perfil de expressão de proteínas de tripanossomatídeos tem permitido identificar e quantificar as proteínas específicas de cada fase do ciclo de vida do mesmo, como também proteínas específicas contidas em frações celulares desses parasitas associados a determinadas manifestações clínicas e até mesmo proteínas envolvidas na imunoestimulação (CUERVO *et al.*, 2010).

A sequência completa do genoma de *L. infantum* possui 8154 genes; dos quais apenas 27 são específicos da espécie, e os outros 8127 são comuns também às espécies *L. major* e *L. braziliensis*. Até então, o genoma de *L. donovani* era baseado na homologia com as outras espécies citadas; o seu sequenciamento completo resultou em mais 20 genes exclusivos da espécie, que talvez possam ser correlacionados com a doença visceral. Contudo, aproximadamente 70% do total previsto do proteoma de *Leishmania spp* ainda não foi identificado (IVENS *et al.*, 2005; PEACOCK *et al.*, 2007; PAAPE *et al.*, 2011; NIRUJOGI *et al.*, 2013).

Assim, a abordagem proteômica tem sido utilizada para investigar a leishmaniose em estudos recentes, como a identificação e caracterização das proteínas secretadas pelo parasito (SILVERMAN *et al.*, 2008; SILVERMAN *et*



*al.*, 2010); dos antígenos do parasito no soro de pacientes e cães infectados das proteínas específicas de cada fase do ciclo de vida (CUERVO *et al.*, 2009; RUKMANGADACHAR *et al.*, 2011; FORGBER *et al.*, 2006), dos mecanismos de resistência às drogas, de novos marcadores diagnósticos e alvos para medicamentos, entre outros (FAKRHY *et al.*, 2002; COELHO *et al.*, 2012; DRUMMELSMITH *et al.*, 2003).

Devido à escassez de estudos envolvendo os mecanismos específicos que regem a interação entre a DPC e a LV, e por não ter trabalhos que incluam as técnicas proteômicas nessa área, o presente estudo objetivou contribuir com a identificação das proteínas expressas por *L. infantum* bem como a avaliação da influência da DPC sobre as mesmas.

## **2-Objetivos**

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

O presente estudo teve como objetivo geral a identificação de proteínas diferencialmente expressas em *L. infantum* após a infecção de camundongos com desnutrição proteica. Além disso, também foi avaliada a influência da desnutrição do hospedeiro vertebrado na resposta imune humoral contra proteínas do parasito.

### **2.2. Objetivos Específicos**

2.2.1 – Avaliar nutricionalmente dos camundongos nos períodos pré e pós infecção por *L. infantum*.

2.2.2 – Avaliar o perfil de crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. infantum* isoladas de camundongos normonutridos e desnutridos.

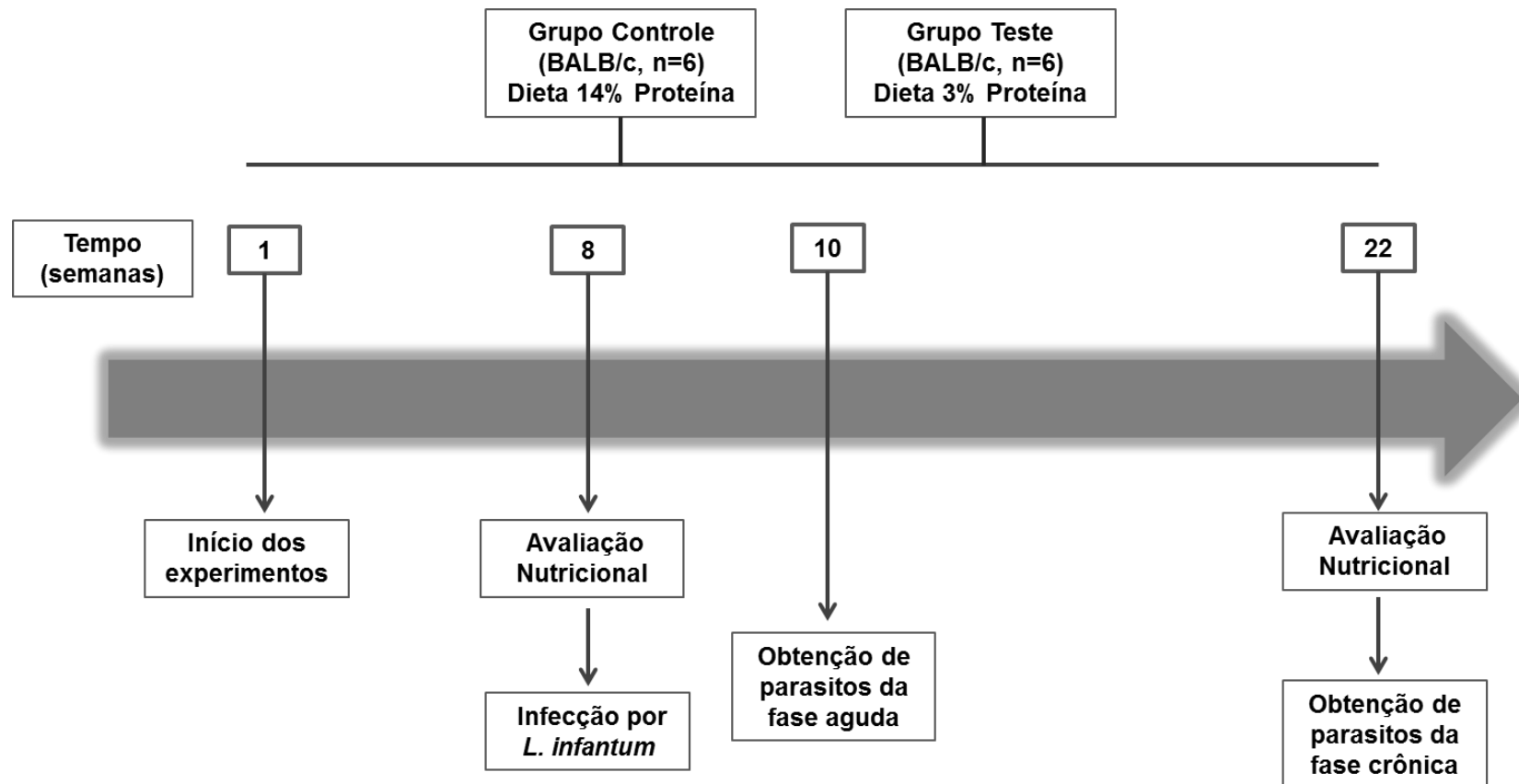
2.2.3 – Analisar comparativamente o perfil proteômico dos parasitos recuperados dos dois grupos, desnutrido (grupo teste) e normonutrido (grupo controle), durante as fases aguda e crônica da doença através da eletroforese bidimensional.

2.2.4 – Identificar as proteínas envolvidas na resposta imune humoral do hospedeiro normonutrido e desnutrido frente à infecção por *L. infantum* utilizando a abordagem imunoproteômica.

## **3-Metodologia**

### 3. Metodologia

#### 3.1. Desenho experimental



### 3.2. Indução à desnutrição e avaliação nutricional

No presente estudo foram utilizados como modelo experimental camundongos BALB/c fêmeas, isogênicos, com idade entre seis e oito semanas e peso corporal médio de 20 gramas. Estes animais foram mantidos em gaiolas, à temperatura entre 21 e 25°C em ciclo de claro e escuro no setor de experimentação em camundongos do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP). Água e ração comercial (diferenciada para cada grupo) foram oferecidos diariamente *ad libitum*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFOP, e os procedimentos realizados estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Código Brasileiro de Experimentação Animal (Protocolo CEUA 2010/42).

Para induzir a desnutrição proteica, os camundongos do grupo teste (n=6) receberam dieta contendo 3% de proteínas, enquanto os do grupo controle (n=6) receberam dieta normal, com 14% de proteínas (**Quadro 2**). Após dois meses, realizou-se a primeira avaliação nutricional, onde os parâmetros investigados foram albumina, proteína total do soro sanguíneo e peso dos animais. A segunda avaliação nutricional foi realizada três meses após a infecção por *L. infantum*.

**Quadro 2. Composição das dietas**

| <b>Ingredientes</b> | <b>Dieta Hipoproteica</b> | <b>Dieta Normal</b> |
|---------------------|---------------------------|---------------------|
| Amido de milho      | 588g                      | 493g                |
| Caseína             | 45g                       | 140g                |
| Amido dextrinizado  | 132g                      | 132g                |
| Óleo de milho       | 40g                       | 40g                 |
| Sacarose            | 100g                      | 100g                |
| Fibra               | 50g                       | 50g                 |
| Mix Mineral         | 35g                       | 35g                 |
| Mix Vitamínico      | 10g                       | 10g                 |
| Total (em kcal)     | 3820 kcal/kg              | 3820 kcal/kg        |

A dosagem de albumina foi realizada em duplicata utilizando solução contendo o reagente verde de bromocresol em tampão acetato de sódio (0,1M; pH 4,0), conforme metodologia proposta por Doumas *et al* (1971). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 628 nm. As proteínas totais presentes no soro foram dosadas com o *kit BCA Protein Assay*, Pierce®. Os animais foram pesados semanalmente, desde o início do experimento.

Assim como o peso, as dosagens de proteína e albumina do grupo controle serviram como valores normais de referência. As análises estatísticas foram realizadas utilizando *Student's t-test* não pareado, através do software *Prism* versão 5.0.

### **3.3. Cultivo de *L. infantum* e infecção experimental**

Animais dos dois grupos experimentais, desnutrido e normonutrido, foram inoculados com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*, cepa C43, obtida a partir de um isolado de cão sintomático e caracterizada por RFLP. O cultivo dos parasitos foi realizado em meio *Grace's Insect Medium* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – LGC, Cotia, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) 100U/mL de penicilina G (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA), pH 6,5 (*Grace's* completo), à temperatura  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Desta maneira, parasitos em início de fase estacionária foram coletados por centrifugação ( $1540 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$ ) e lavados três vezes em tampão fosfato salina (PBS). O inóculo foi preparado na concentração estimada de  $1 \times 10^7$  parasitos/200 $\mu\text{L}$ , após a contagem em câmara de Neubauer. Os parasitos foram inoculados por via intravenosa na cauda dos animais dos grupos controle e teste, obtendo-se, assim, a infecção experimental.

### **3.4. Avaliação da carga parasitária no fígado e baço durante a fase crônica da infecção**

Após quinze semanas da infecção experimental (fase crônica da doença), realizou-se a necropsia dos animais. Esses foram eutanasiados por

overdose de anestésicos (cloridrato de quetamina 10% - Syntec- a 24,0 mg/Kg e cloridrato de xilazina 2,3% - Sespo Indústria e Comércio/LTDA- a 12,0 mg/Kg), e submergidos em álcool 70% (v:v) por 2 minutos. Assim, sob condições assépticas, os animais tiveram sua cavidade abdominal aberta com auxílio de tesoura cirúrgica, e retiraram-se fragmentos de fígado e o baço. Esses tecidos foram pesados, e mantidos em banho de gelo imersos em meio de lavagem (pH 7,2) constituído por DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 1% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina e 100 U/mL de penicilina G. A porção restante do fígado foi coletada para determinação da massa total do órgão. Em seguida, realizou-se a maceração individual dos fragmentos de fígado e os baços com o auxílio de um macerador de órgãos (Pyrex<sup>®</sup> 2 mL TenBroeck homogenizer with pour spout) e o sobrenadante foi coletado em tubo cônico de 15 mL. A fim de retirar os fragmentos de órgão, o volume total de maceração do fragmento de fígado e um quinto do volume obtido pela maceração do baço foram submetidos à centrifugação a 42 x g/ 1 min/ 4°C. Coletou-se o sobrenadante, e este foi novamente centrifugado a 1540 x g/ 10 min 4°C. O pellet resultante, rico em parasitos, foi ressuspendido em 500µL de meio Grace, como anteriormente descrito. O material obtido foi plaqueado, em duplicata, em placas de 96 poços de fundo chato, seguindo diluições sucessivas 1:5 (v:v) em meio Grace. As placas foram incubadas à temperatura 25 ± 1°C. Após sete dias, foi possível detectar por microscopia óptica a proliferação de formas promastigotas do parasito. Os parasitos foram quantificados considerando o recíproco da mais alta diluição positiva para parasitos móveis. Este número foi considerado a concentração de parasitos por miligrama de tecido. A multiplicação desta concentração pelo peso total do órgão forneceu a carga parasitária no fígado e baço dos animais. As análises estatísticas para comparação da quantidade de parasitos encontrada nos órgãos dos grupos teste e controle foram realizadas utilizando *Student's t-test* não pareado, através do software *Prism* versão 5.0.



### **3.5. Cultura e curva de crescimento dos parasitos da cepa C43 de *L. infantum* reisolados de camundongos normonutridos e desnutridos**

A fim de isolar os parasitos derivados de cada um dos grupos experimentais, utilizou-se uma alíquota de 100µL da solução de parasitos das placas de 96 poços (item 3.3), a qual foi transferida para uma garrafa de cultura contendo 10 mL de meio Grace. O recipiente foi incubado em estufa biológica mantida à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , com acompanhamento diário do crescimento da cultura.

Para se estabelecer a curva de crescimento, *in vitro*, dos parasitos em meio Grace, após o reisolamento dos mesmos provenientes das placas de quantificação, realizou-se um repique com inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  parasitos/mL. Assim, realizou-se diariamente a contagem em câmara de Neubauer, após diluição suficiente para a realização de contagem com precisão.

### **3.6. Expansão das culturas de *L. infantum* e obtenção dos extratos proteicos**

Promastigotas isolados de camundongos normonutridos e desnutridos foram expandidos em cultura. Os parasitos em fase exponencial de crescimento foram coletados por centrifugação ( $1540 \times g$  / 10 min  $4^\circ\text{C}$ ) e lavados três vezes em tampão fosfato pH 7,2. A quantidade de parasitos obtida foi estimada em câmara de Neubauer.

Para obtenção dos extratos solúveis de *L. infantum*, foram utilizadas as massas celulares dos parasitos dos dois grupos, teste e controle, nas fases aguda (duas semanas de infecção) e crônica (três meses de infecção). Aproximadamente  $2,32 \times 10^9$  e  $2,9 \times 10^9$  parasitos foram utilizados para os extratos da fase aguda e da fase crônica, respectivamente. A massa celular foi ressuspendida em aproximadamente 1 mL de tampão de re-hidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2% (3-[(3-Cholamidopropil) dimetilamônio]-1-propanosulfonato) e traços de azul de bromofenol), foi adicionado 5µL de coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich) em cada tubo, e manteve-se sob agitação à temperatura de  $4^\circ\text{C}$  por 90 minutos. Posteriormente, o preparado foi

centrifugado a 40.000 x *g* (19.600 RPM), à 10°C, por 120 minutos em centrífuga Sorvall 5C. Coletou-se o sobrenadante, e o mesmo foi submetido à precipitação das proteínas com ácido tricloroacético (TCA) e acetona. A cada 100 µL de sobrenadante foram adicionados 800 µL de acetona P.A gelada (4°C) e 100 µL de solução de TCA 100%. A mistura foi homogeneizada e deixada *overnight*, à -20°C, para precipitação das proteínas. Após a precipitação, a mistura foi centrifugada a 40.000 x *g* por 30 minutos a 4°C em centrífuga Sorvall 5C. O precipitado foi ressuscitado e lavado por 2 vezes com 500 µL de acetona gelada e novamente centrifugado a 4°C e 40.000 x *g* por 30 minutos. O precipitado de proteínas foi deixado à temperatura ambiente para evaporação total da acetona. Finalmente, o precipitado foi ressuscitado em 200 µL de tampão de reidratação (uréia 7 M; tiouréia 2 M; CHAPS).

### **3.7. Eletroforese unidimensional e coloração por coomassie coloidal G-250**

Os extratos foram submetidos à eletroforese unidimensional (12% SDS-Page) para análise. As amostras, contendo 10 µg de proteína, foram diluídas em tampão de amostra (Tris- HCl 0,125 M pH 6.8; SDS 4%; glicerol 20%; DTT 100 mM e traços de azul de bromofenol) na proporção de 1:1 (v:v), e submetidas à fervura por 5 minutos antes da aplicação no gel. Foram aplicados 5 e 10 µL de cada amostra. A eletroforese foi realizada a 20 mA por gel em aproximadamente 2 horas. O gel foi corado com Coomassie Coloidal G250. A primeira etapa da coloração foi *overnight*, à temperatura ambiente, em 100 mL de solução (ácido ortofosfórico 2%; etanol 30%, v:v). No dia seguinte, foram realizadas mais duas etapas de 30 minutos com a mesma solução e, em seguida, lavados 3 vezes por 10 minutos em 50 mL da segunda solução (ácido ortofosfórico 2%, v:v). A terceira solução (ácido ortofosfórico 2%,v:v; etanol 18%, v:v; sulfato de amônio 15%, p:v) foi utilizada nas duas etapas finais: primeiramente o gel foi incubado em 50 mL da solução por 30 minutos e, depois, adicionado 1 mL de coomassie coloidal G250 2% em 100 mL da mesma solução no gel por até 72 horas. Após a coloração, o gel foi lavado em etanol 20% (v:v), por até 5 minutos, para a retirada do excesso de corante. Todas as etapas foram feitas sob agitação. Após a coloração, foi realizada a

densitometria das amostras com auxílio do software *Quantity One*<sup>®</sup>, e definida a quantidade de amostra que seria aplicada no gel bidimensional.

### 3.8. Eletroforese bidimensional

Os extratos proteicos solúveis dos parasitos das fases aguda e crônica da doença foram submetidos à eletroforese bidimensional para posterior comparação entre os grupos controle e teste. Primeiramente, as amostras foram submetidas ao processo de isoeletrofocalização (IEF) no aparelho *Ettan IPGphor III* (*GE, healthcare*), a fim de separar as proteínas de acordo com o ponto isoelétrico (primeira dimensão). A cada amostra foi adicionado 1% de DTT, 0,8% de anfólitos (*IPG buffer*, pH 3-10, não linear), e tampão de rehidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2% e traços de azul de bromofenol). As *strips* (*Immobiline DryStrip Gels* 7 e 13 cm; pH 3-10, Não-linear, *GE Healthcare*), foram colocadas suavemente em cima da amostra no *Strip holder* (*GE Healthcare*) para a incorporação das proteínas no gel de primeira dimensão, seguido da adição de 500 µL de *cover fluid* (*GE Healthcare*).

O processo de IEF ocorreu à temperatura de 20°C, à 50 µA/gel. Para as *strips* de 7cm, seguiu-se o protocolo: 1º etapa - reidratação por 12 horas; 2º etapa - 300V durante 30 minutos; 3º etapa - 1000V por 30 minutos, 4º etapa - 8000V por 3 horas. Para as *strips* de 13cm, o programa de isoeletrofocalização consistiu de: 1º etapa – 14 horas de reidratação; 2º etapa – 500 V por 60 minutos; 3º etapa – 1000 V por 60 minutos; 4º etapa – 8000 V por 2 horas e 30 minutos; 5º etapa – 8000 V por 60 minutos. Após a IEF, a *strip* foi submetida aos processos de redução e alquilação em solução de equilíbrio (uréia 6M, Tris- HCL 75 mM pH 8.8; glicerol 29,3%, p:v; SDS 2%, p:v; azul de bromofenol 0,002%, p:v). A etapa de redução consistiu da adição de 3 mL de solução de equilíbrio com DTT 1% (p:v), por 15 minutos, a fim de reduzir as pontes dissulfeto das proteínas presentes na *strip*. A solução de redução foi descartada e adicionou-se mais 3 mL da solução de equilíbrio com iodoacetamida 4% (p:v) por mais 15 minutos para a etapa de alquilação, a fim de promover a alquilação dos grupos tíois e impedir a nova formação de pontes dissulfeto.

Em seguida, as *strips* foram posicionadas em géis de poliacrilamida (12%) para realização da eletroforese com a separação das proteínas de acordo com a massa molecular (segunda dimensão). Os géis de poliacrilamida foram selados com agarose 1,2% (p:v), diluída em tampão de corrida (0,0025 M Tris, pH 8,3; 0,192 M glicina; 0,1% SDS, p:v). A eletroforese ocorreu a 50 V por gel nos primeiros 20 minutos, e a 100 V no restante da corrida, por aproximadamente 3 horas, para as *strips* de 7 cm, e 7 horas para as *strips* de 13 cm. Os géis foram corados com a técnica de Coomassie Coloidal G250, conforme descrito anteriormente. . As imagens dos géis foram obtidas através do scanner *ImageScanner III (GE healthcare)*, e a análise comparativa dos extratos dos parasitos recuperados dos animais dos dois grupos em cada fase foi realizada visualmente e através do *software* LUDESI REDFIN 3.

Os *spots* diferencialmente expressos em cada grupo foram excisados e armazenados em tubos do tipo *ependorf*, a 4°C em 1 mL de solução descorante (etanol 40%, ácido acético 7%, v:v) a fim de conservar e descorar o fragmento de gel para, posteriormente, serem submetidos à digestão e análise no espectrômetro de massas

### **3.9. Análise Imunoproteômica**

Géis uni e bidimensionais foram confeccionados com o extrato do grupo controle e transferidos para membranas de PVDF (Polyvinylidene Difluoride, 0.2 µm) no sistema semi-seco TE-77 *Amersham*®, a 0,8 mA por cm<sup>2</sup> de gel por 1 hora. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em solução de bloqueio (leite em pó 5%, p:v; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; tween 20 a 0,3%, v:v) durante a noite, à temperatura ambiente, e posteriormente lavadas 3 vezes por 5 minutos em Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Em seguida, as membranas foram incubadas com o *pool* dos soros (n=4) dos camundongos controle e teste, na diluição 1:400 em tampão de *immunoblot* (leite em pó 5%, p:v; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; tween 20 a 0,3%, v:v), à temperatura ambiente, por 3 horas. As membranas foram lavadas novamente com a solução Tris-HCl 10 mM pH 7.5, 3 vezes por 5 minutos e foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina (Sigma) na diluição 1:4000 em tampão de *immunoblot*, por 2 horas, à temperatura ambiente.

Realizou-se a última etapa de lavagem com a solução Tris-HCl 10 mM pH 7.5 por 3 vezes durante 5 minutos, e a detecção das proteínas marcadas foi realizada a partir da incubação das membranas com solução contendo os substratos para fosfatase alcalina NBT/BCIP (*Nitro-Blue Tetrazolium Chloride / 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt* - Sigma), conforme as recomendações do fabricante.

Os *spots* reativos presentes na membrana obtida por transferência de gel bidimensional foram excisados do gel réplica, e armazenados em *ependorfs* à temperatura de 4°C em 1 mL de solução descorante (etanol 40%, ácido acético 7%, v:v), para posterior digestão e análise no espectrômetro de massas.

### **3.10. Digestão *in gel***

Os *spots* excisados foram submetidos ao protocolo de digestão *in gel*. Brevemente, os *spots* foram lavados duas vezes com 1 mL de água miliQ, e submetidos, posteriormente, a mais uma etapa de redução e alquilação. Para a redução, adicionou-se solução contendo 6mM de DTT, e os tubos foram incubados por 30 minutos a 65°C. A solução contendo DTT foi removida e foi adicionada, em seguida, solução contendo 12mM de iodoacetamida. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 1 hora. Após a remoção da solução contendo iodoacetamida, foi adicionado solução para desidratação dos *spots* (bicarbonato de amônio 20mM; acetonitrila 50%, v:v), por 3 vezes, 20 minutos por lavagem. Em seguida, as amostras foram desidratadas por completo em um concentrador a vácuo (*Speed Vac*), e rehidratadas com solução contendo bicarbonato de amônio 20 mM e 30 ng/μL de tripsina (MS Grade, Promega). Após 20 minutos, o excesso de solução de tripsina foi retirado e os *spots* recobertos com cerca de 40 μl de solução NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a 20mM. A tripsinólise ocorreu a 37°C por, pelo menos, 12 horas.

No dia seguinte, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo. Para a recuperação dos peptídeos ainda restantes na matriz do gel, foi adicionada solução de ácido trifluoroacético 0,1% e acetonitrila 50% (v:v), e mantido a temperatura ambiente por 30 minutos. Mais uma vez o sobrenadante foi coletado e adicionado ao primeiro. Os tubos foram levados novamente ao

concentrador a vácuo, e o material seco foi armazenado a 4°C para posterior análise por espectrometria de massas.

### 3.11. Identificação por espectrometria de massas

Após o processo de digestão *in gel*, os peptídeos resultantes foram analisados no Setor de Espectrometria de Massas do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM, Campinas – SP). Inicialmente, os peptídeos foram solubilizados em 12 µL de ácido fórmico 0.1% e cerca de 4 µL submetidos à pré-coluna nanoAcquity Symmetry C18, 5 µm (180 µm x 20 mm, Waters) acoplada ao sistema nanoAcquity UPLC (Waters) utilizando ácido fórmico a 0.1% (v/v) a um fluxo de 10 µL/min. A pré-coluna foi lavada durante 5 minutos e, em seguida, o fluxo foi direcionado para a coluna capilar nanoAcquity BEH130 1.7 µm C18 (75 m x 250 mm, Waters). A separação dos peptídeos nesta coluna ocorreu a partir da utilização de dois solventes, solvente A – 0.1% ácido fórmico e solvente B – 100% ACN/0.1% ácido fórmico. O fluxo para a coluna capilar foi de 300 nL/min, a temperatura da coluna ajustada para 60°C e o perfil do gradiente estabelecido segundo as condições: 5% solvente B por 2 min, seguido por um gradiente linear até 35% solvente B durante 20 min. Finalmente, lavou-se a coluna utilizando 95% solvente B por 2.5 min.

Este sistema de nanocromatografia, associado ao espectrômetro Q-ToF Ultima (*Micromass – Waters*) contendo uma fonte de nano-electrospray, constituiu o equipamento utilizado para a detecção e fragmentação dos peptídeos. Espectros MS e MS/MS foram adquiridos utilizando o modo AutoMSMS. Os parâmetros de espectrometria de massas para o modo MS incluíram: voltagem do íon “spray” 1500 V, gás de secagem a 6L/min, temperatura do gás de secagem 160°C, faixa de aquisição m/z 50-2.200. No modo AutoMSMS as condições foram as seguintes: dissociação induzida por colisão com gás N<sub>2</sub>, faixa de aquisição m/z 350-1.400, carga dos íons selecionados para fragmentação +2, +3 e +4 e exclusão de íons com carga +1.

Dados obtidos a partir dos espectros MS/MS foram submetidos à busca de identidade utilizando uma cópia local do programa Mascot (Matrix Science Ltd., version 2.1). Os bancos de dados utilizados foram o NCBI nr e o

NCBI\_*Leishmania*. As buscas levaram em consideração os seguintes critérios: enzima – Tripsina; modificação fixa – carbamidometilação (C); modificação variável – oxidação (M); tolerância para íon precursor - 10 ppm; tolerância para íons provenientes de fragmentação - 0.1 Da. Considerou-se uma taxa de falsos positivos (FDR) de 5% e os peptídeos que apresentaram expect value  $\leq 0.05$  foram considerados identificações significativas.

As proteínas identificadas foram agrupadas em 10 categorias distintas de acordo com o processo biológico ao qual pertencem: citoesqueleto, chaperonas, biossíntese protéica, metabolismo de carboidratos, metabolismo de nucleotídeos, degradação protéica, metabolismo de aminoácidos, resposta antioxidante, outros processos e hipotética. Para a categorização, foram utilizadas as anotações presentes no banco de dados *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org>). As proteínas categorizadas como hipotéticas foram submetidas a posterior análise por BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>).

## **4-Resultados**



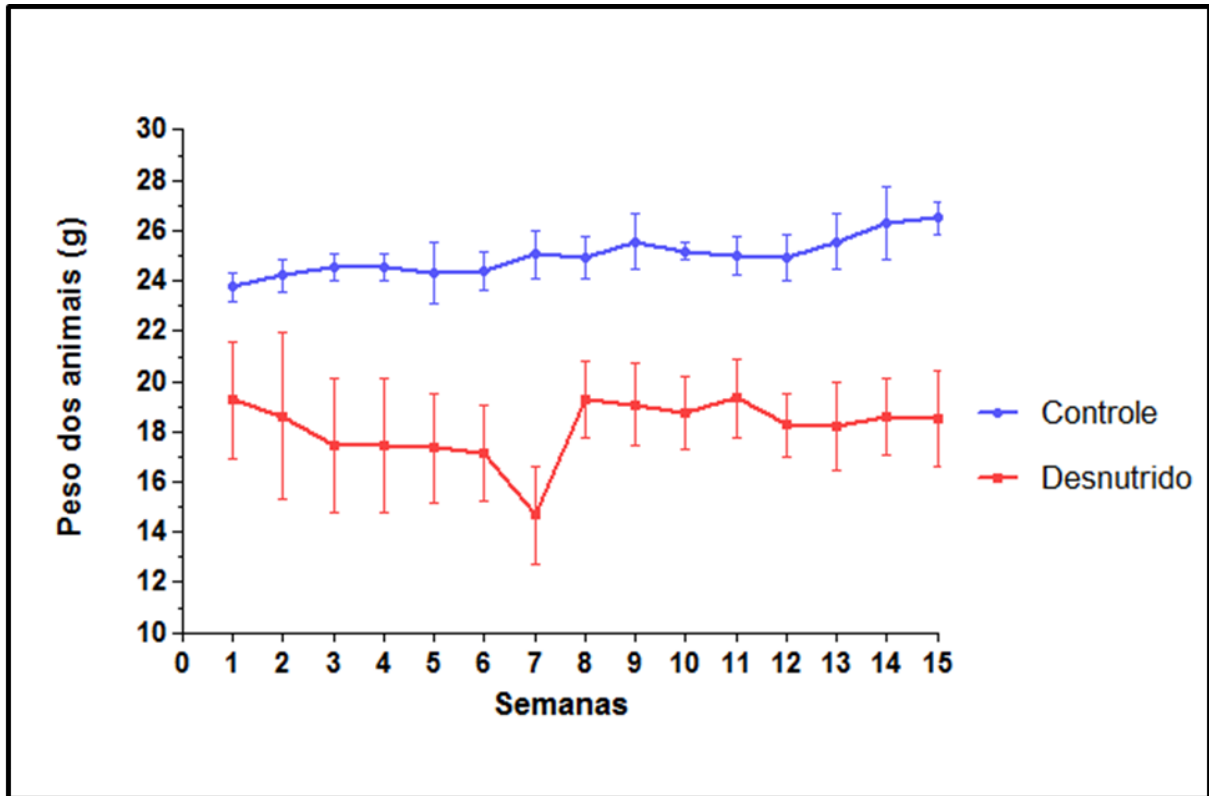
## 4. Resultados

### 4.1. Indução à desnutrição – acompanhamento do peso, níveis séricos de albumina e proteína

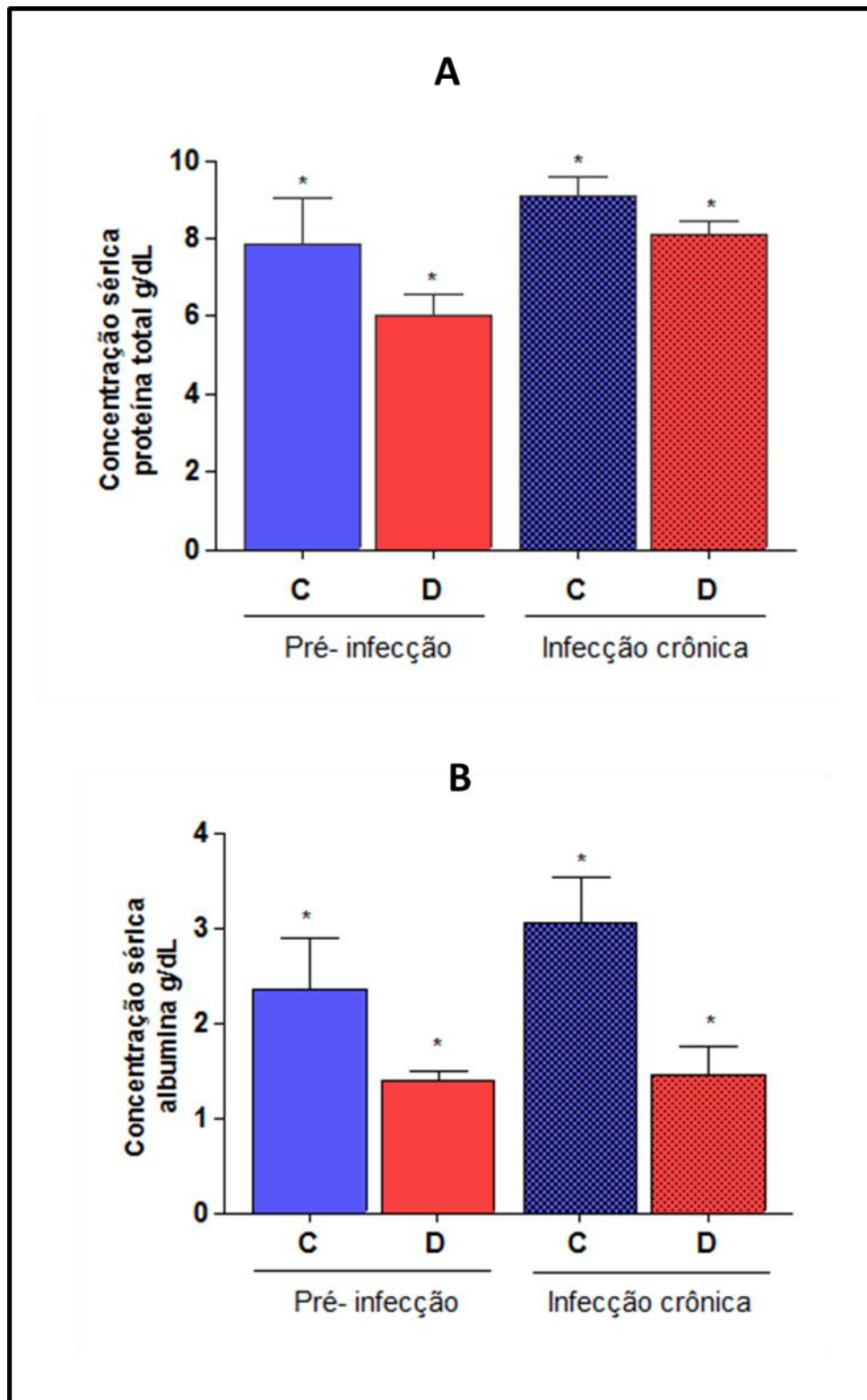
Conforme descrito na seção metodologia, ao longo de todo experimento, os camundongos do grupo teste receberam dieta contendo 3% de proteínas, e os do grupo controle receberam dieta com 14% de proteínas. Para avaliar o estado nutricional dos animais, foram utilizados os parâmetros peso, e níveis séricos de proteína total e albumina.

A **figura 3** mostra a média e o desvio padrão do peso dos animais de cada grupo semanalmente após a infecção com *L. infantum*. Observou-se uma diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre a média de peso dos animais do grupo teste ( $18,13 \pm 0,31$ ) e do grupo controle ( $24,96 \pm 0,18$ ) que se manteve durante todo o experimento. Essa diferença foi observada também no período pré-infecção. Nas duas semanas seguintes à infecção por *L. infantum*, na fase aguda da doença, observou-se um decréscimo de peso entre os animais do grupo desnutrido. A média do peso dos camundongos desse grupo foi semelhante da terceira à sexta semana, com uma queda brusca na sétima semana, onde foi observado o menor peso médio desses animais. Contudo, a partir da oitava semana de infecção, houve uma recuperação do peso dos animais do grupo desnutrido, que se manteve até a última semana. Ou seja, o parasitismo não agravou o estado nutricional dos animais na fase crônica da doença. A média do peso dos animais do grupo controle foi semelhante durante as 15 semanas após a infecção.

Com o intuito de avaliar os parâmetros bioquímicos indicativos do estado nutricional, após a 8ª semana de indução à desnutrição (pré-infecção) e na 15ª semana após a infecção (fase crônica), o sangue dos animais do grupo teste e controle foi obtido para a dosagem de proteína total e albumina (**figura 4**). Observou-se uma diferença significativa ( $p < 0.05$ ) na proteína total sérica nos animais do grupo teste e controle para os períodos pré-infecção e infecção crônica. Em paralelo, os níveis de albumina dos animais do grupo teste mostraram-se alterados, corroborando com os resultados obtidos para proteína total. A infecção por *L. infantum* não acarretou alterações significativas nos níveis de proteína total e albumina dos animais sob investigação.



**Figura 3. Média do peso dos animais a cada semana após a infecção por *L. infantum*.** O gráfico representa a média do peso dos animais após o inóculo. As análises estatísticas foram realizadas através do software Prism versão 5.0, utilizando-se *Student's t-test* não pareado. \*  $p < 0.05$



**Figura 4. Dosagem de proteína e albumina sérica dos animais antes e depois da infecção.** Os gráficos representam a comparação entre os níveis séricos de proteína total (A) e albumina (B) do grupo controle e do teste nos períodos pré-infecção e durante a infecção crônica. As análises estatísticas foram realizadas através do software Prism versão 5.0, utilizando-se Student's t-test não pareado. \*  $p < 0.05$

#### **4.2. Curva de crescimento e quantificação de parasitos no baço e fígado.**

A fim de analisar o crescimento *in vitro* dos parasitos, realizou-se um repique com inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  promastigotas/mL recuperados do fígado dos animais dos grupos teste e controle provenientes da fase crônica da doença. A contagem de parasitos foi realizada diariamente em câmara de Neubauer, após diluição suficiente para a contagem com precisão.

A **figura 5** representa o gráfico da curva de crescimento de *L. infantum in vitro*. Observou-se que as cepas isoladas dos camundongos normonutridos e desnutridos cresceram de forma similar até o terceiro dia. Contudo, os promastigotas recuperados dos animais do grupo desnutrido apresentaram pico de crescimento diferente com relação aos recuperados dos animais do grupo controle. No quinto dia, a cultura de *L. infantum* isolada de camundongos desnutridos apresentou  $3,96 \times 10^6$  parasitos a mais que a cultura de *L. infantum* proveniente dos animais do grupo controle. O pico de proliferação para ambas as culturas ocorreu no sexto dia, mantendo-se a diferença no número total de promastigotas. No sétimo dia, observou-se uma diminuição na contagem de parasitos, devido às condições do meio de cultura.

Com o intuito de verificar se a diferença de proliferação de parasitos observada *in vitro* também poderia ocorrer *in vivo*, carga parasitária total do fígado e baço dos animais dos dois grupos foi avaliada. Como representado na **figura 6**, observou-se uma diferença significativa na quantidade de parasitos no fígado entre os animais do grupo teste e controle. O mesmo não foi observado no baço desses animais.

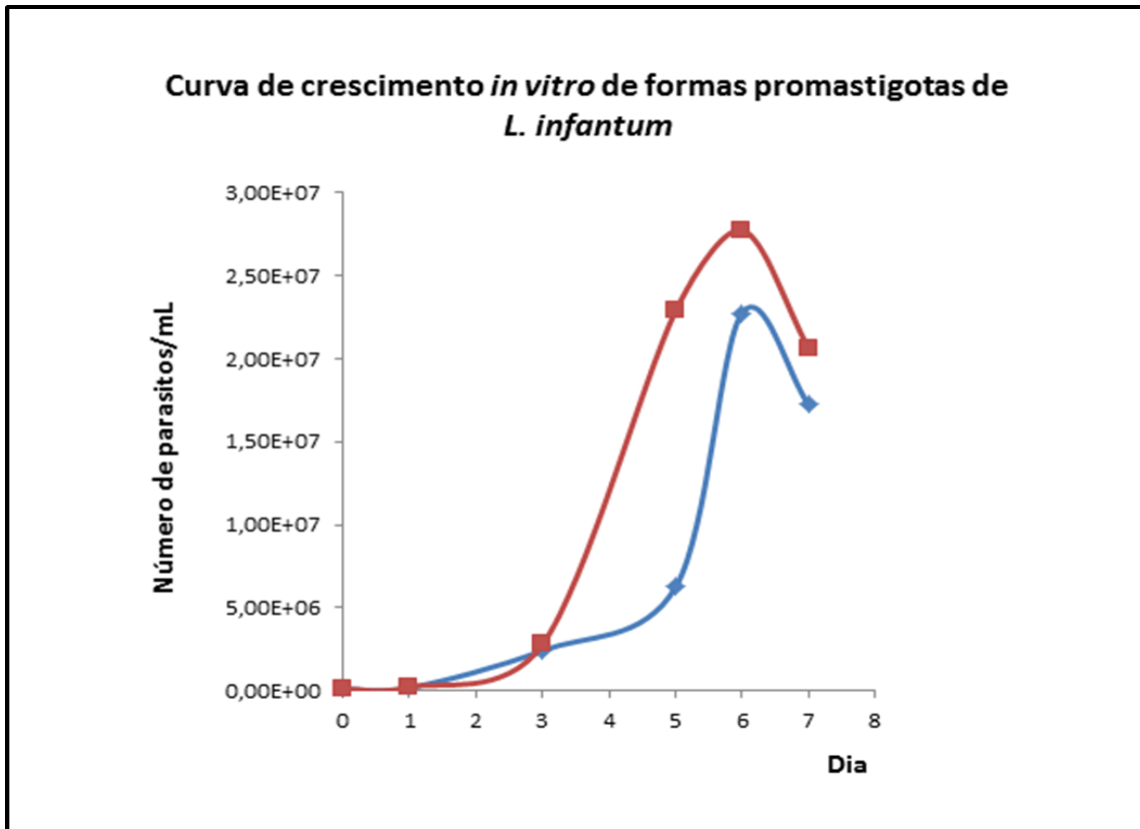


Figura 5. Curva de crescimento *in vitro* das formas promastigotas recuperadas do fígado dos animais dos grupos teste e controle. Acompanhamento do crescimento em meio de cultura de cepas de *L. infantum* recuperados de camundongos desnutrados (em vermelho) e normonutridos (em azul) no período de sete dias.

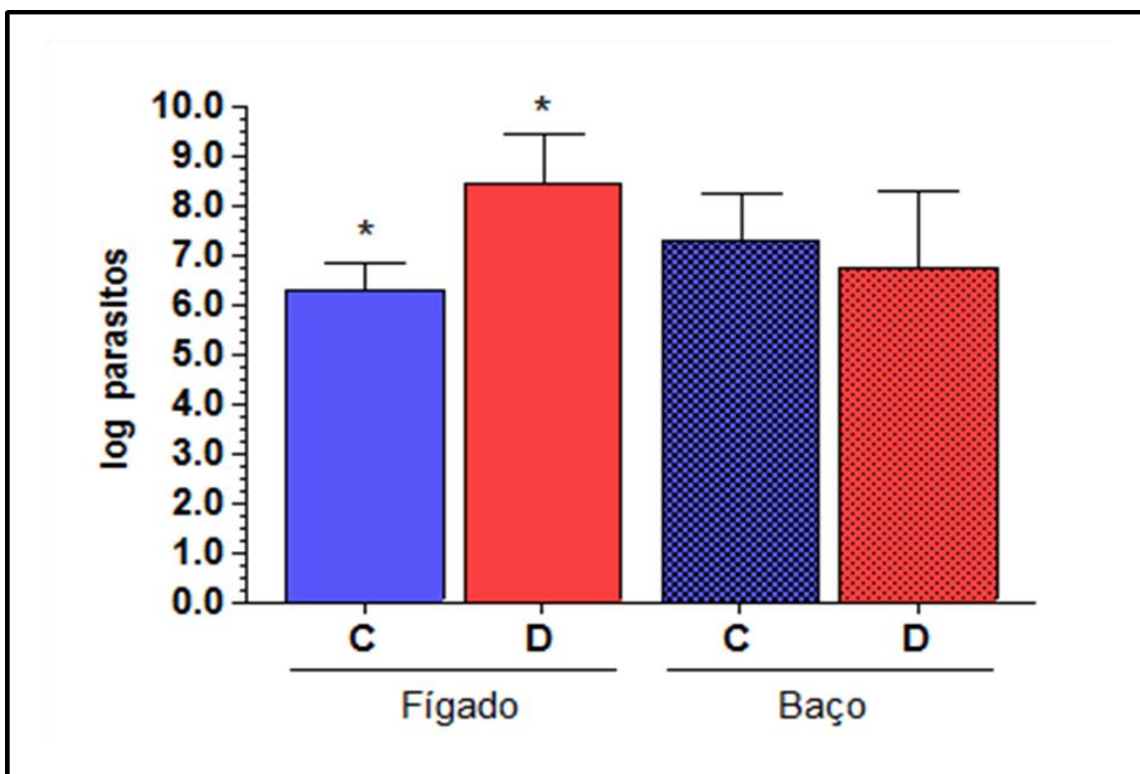
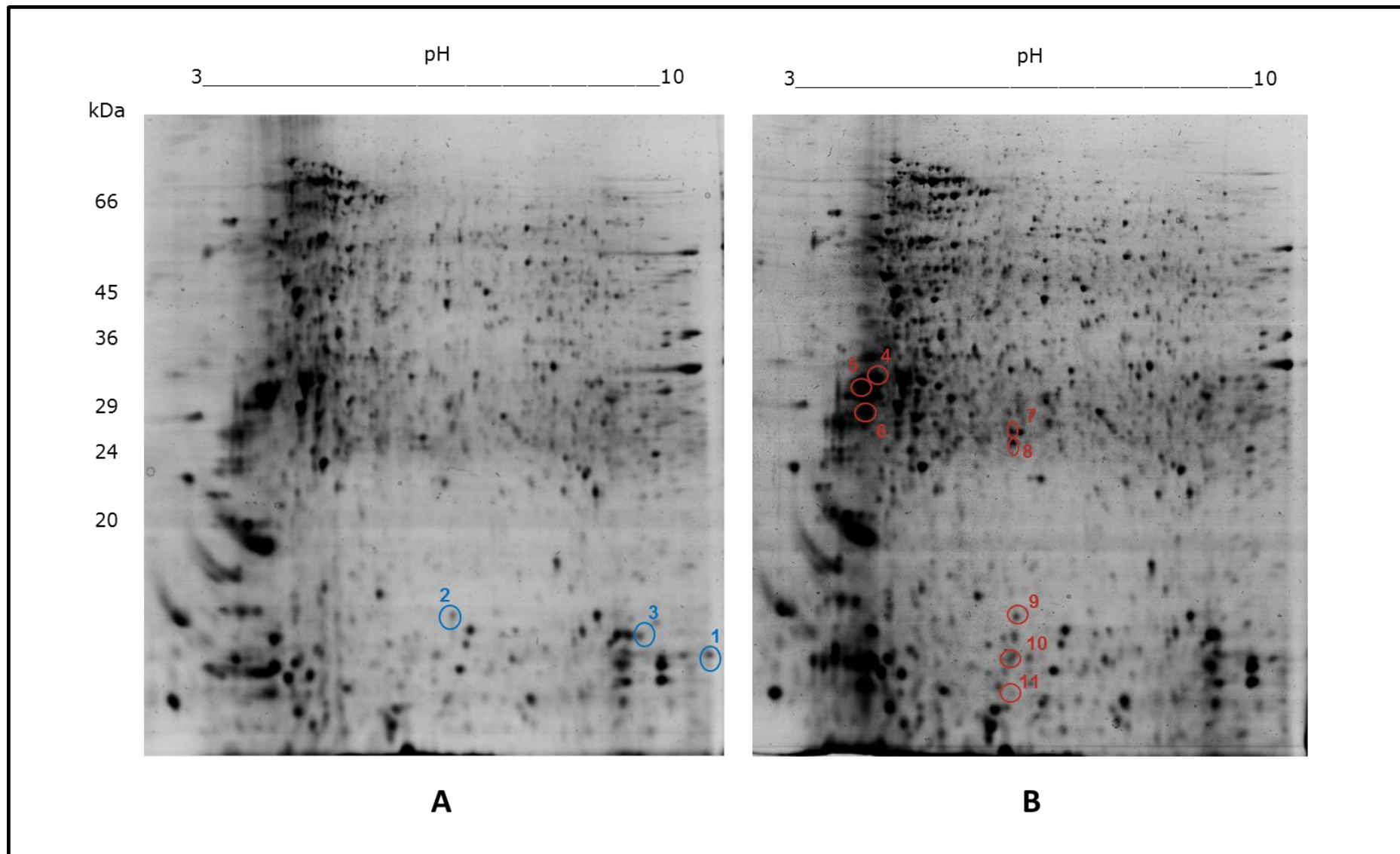


Figura 6. Quantificação de parasitos no baço e fígado dos animais após 3 meses de infecção. Os gráficos representam a comparação entre a média do log de parasitos no fígado e no baço do grupo controle (C) e do teste (D) na fase crônica da doença. As análises estatísticas foram realizadas através do software Prism versão 5.0, utilizando-se Student's *t*-test não pareado. \*  $p < 0.05$ .

#### **4.2. Perfil proteico dos parasitos recuperados dos camundongos dos grupos teste e controle em eletroforese bidimensional (SDS-PAGE) – análise comparativa**

Os géis bidimensionais foram confeccionados com os extratos de promastigotas recuperados das fases aguda e crônica da doença de ambos os grupos (teste e controle). Esses foram comparados com o auxílio do *software* LUDESI REDFIN 3 (**Anexo 1 e 2**) e visualmente. Uma análise global revelou poucas diferenças entre os proteomas dos parasitos provenientes dos animais do grupo teste e controle em cada fase (**figura 7 e 8**), o que justificou a investigação de proteínas presentes exclusivamente em cada extrato. A análise comparativa entre os géis com os extratos de fase aguda possibilitou a observação de 11 *spots* diferencialmente expressos entre os grupos; já entre os extratos de fase crônica, observou-se 9 *spots*. No geral, foi possível verificar maior número de alterações no proteoma dos parasitos recuperados dos animais desnutridos. As proteínas de interesse foram excisadas do gel, submetidas ao protocolo de digestão e os peptídeos obtidos foram analisados por espectrometria de massas. Os resultados de busca de identidades em bancos de dados foram compilados nas **tabelas 2 e 3**.

De um modo geral, observou-se que, dentre as proteínas identificadas nas fases aguda e crônica, somente 12 apresentaram boa concordância entre os parâmetros teóricos e experimentais. Dessa forma, foi possível identificar que, dentre as proteínas diferencialmente expressas nos extratos dos parasitos recuperados da fase aguda, quatro tem função estrutural (*spots* 5, 6 e 8) e quatro são proteínas hipotéticas da espécie, sem função definida (*spots* 1, 7, 10 e 11). Já nos extratos da fase crônica, seis estão relacionadas à biossíntese de proteínas (*spots* 2, 3, 4, 5, 6 e 9), duas estão relacionadas ao metabolismo energético (*spots* 1 e 7) e 1 é considerada uma proteína hipotética (*spot* 8).

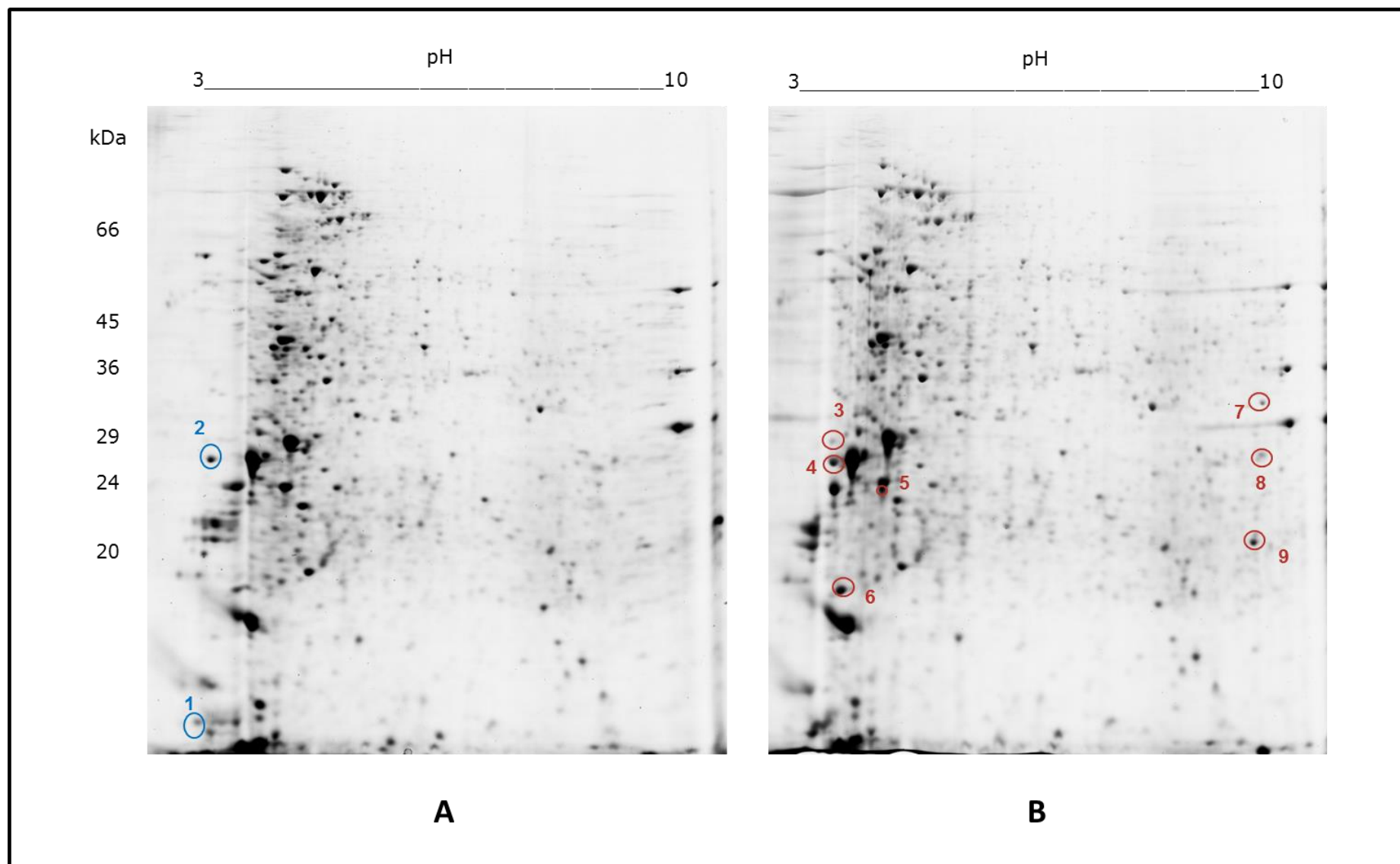


**Figura 7: Géis bidimensionais representativos do perfil proteômico de *L. infantum* recuperados na fase aguda (2 semanas) da doença. A) Grupo Controle, spots diferencialmente expressos marcados em azul. B) Grupo Teste, spots diferencialmente expressos marcados em vermelho. Géis de poliacrilamida, 12%, 13 cm, pH 3-10, SDS-PAGE. Géis representativos de dois experimentos diferentes.**

**Tabela 1:** Proteínas diferencialmente expressas nos extratos proteicos dos parasitos recuperados dos grupos controle e desnutrido na fase aguda da leishmaniose visceral.

| <b>Spot</b>                                                   | <b>Proteína</b>                                            | <b>Acesso</b> | <b>Massa (kDa)</b> | <b>pI</b> | <b>% cobertura</b> | <b>Score</b> |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------|--------------------|-----------|--------------------|--------------|
| <b>Proteínas presentes exclusivamente no grupo controle</b>   |                                                            |               |                    |           |                    |              |
| 1                                                             | Proteína hipotética                                        | gi 134072901  | 16.663             | 9.30      | 11%                | 74           |
| 2                                                             | (Proteína não identificada com <i>score</i> significativo) | -             | -                  | -         | -                  | -            |
| 3                                                             | (Proteína não identificada com <i>score</i> significativo) | -             | -                  | -         | -                  | -            |
| <b>Proteínas presentes exclusivamente no grupo desnutrido</b> |                                                            |               |                    |           |                    |              |
| 4                                                             | (Proteína não identificada com <i>score</i> significativo) | -             | -                  | -         | -                  | -            |
| 5                                                             | Beta tubulina                                              | gi 134067536  | 50.395             | 4.71      | 11%                | 160          |
| 6                                                             | Beta tubulina                                              | gi 134067537  | 50.334             | 4.74      | 13%                | 259          |
| 7                                                             | Proteína hipotética                                        | gi 134068298  | 15.489             | 5.93      | 7%                 | 82           |
| 8                                                             | Beta tubulina                                              | gi 134067537  | 50.334             | 4.44      | 8%                 | 152          |
| 9                                                             | (Proteína não identificada com <i>score</i> significativo) | -             | -                  | -         | -                  | -            |
| 10                                                            | Proteína hipotética                                        | gi 134068298  | 15.489             | 5.93      | 7%                 | 82           |
| 11                                                            | Proteína hipotética                                        | gi 134072901  | 16.663             | 9.30      | 16%                | 149          |





**Figura 8: Géis bidimensionais representativos do perfil proteômico de *L. infantum* recuperados na fase crônica (3 meses) da doença. A) Grupo Controle, spots diferencialmente expressos marcados em azul. B) Grupo Teste, spots diferencialmente expressos marcados em vermelho. Géis de poliacrilamida, 12%, 13 cm, pH 3-10, SDS-PAGE. Géis representativos de dois experimentos diferentes.**

**Tabela 2:** Proteínas diferencialmente expressas nos extratos proteicos dos parasitos recuperados dos grupos teste e controle na fase crônica da leishmaniose visceral.

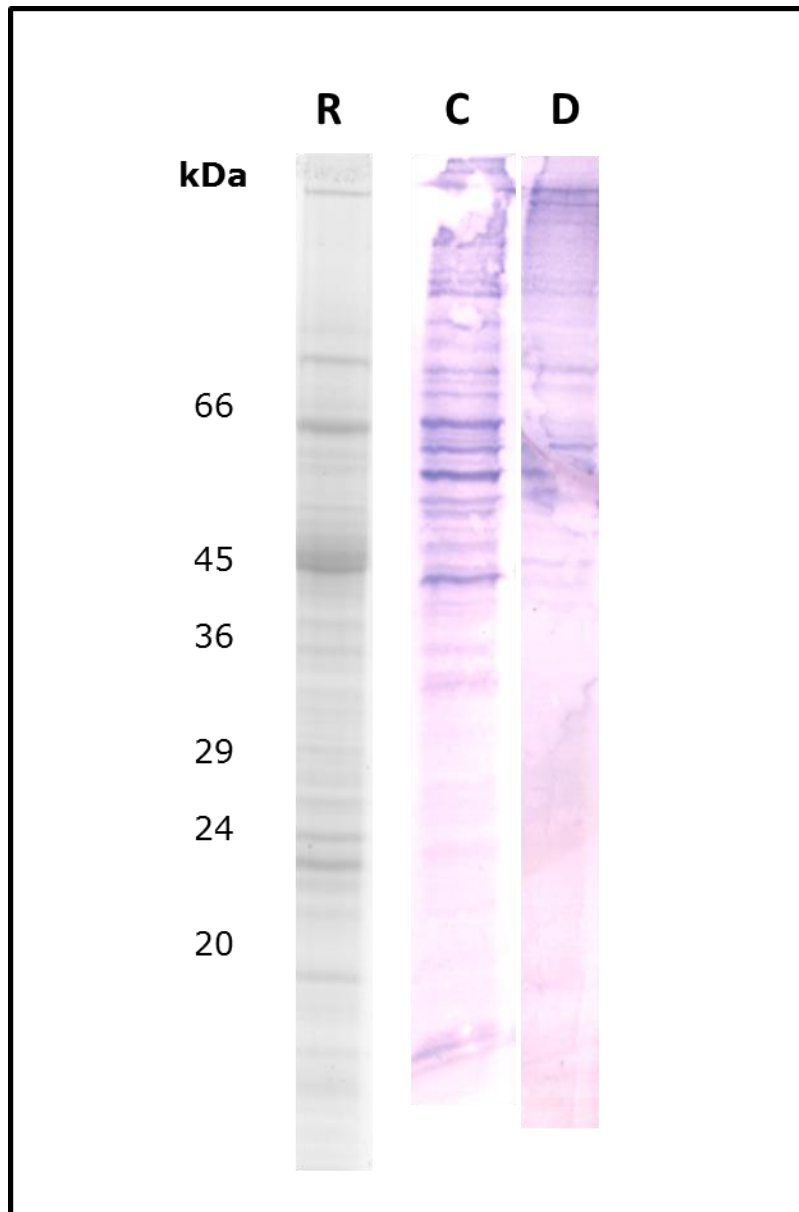
| <i>Spot</i>                                                                            | Proteína                               | Acesso       | Massa (kDa) | pI   | % cobertura | Score |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------|-------------|------|-------------|-------|
| <b>Proteínas presentes exclusivamente no extrato dos parasitos do grupo controle</b>   |                                        |              |             |      |             |       |
| 1                                                                                      | Cisteína peptidase <i>calpain-like</i> | gi 134068361 | 13.037      | 4.70 | 23%         | 178   |
| 2                                                                                      | Fator de alongamento 1- beta           | gi 134074101 | 23.220      | 4.61 | 4%          | 114   |
| <b>Proteínas presentes exclusivamente no extrato dos parasitos do grupo desnutrido</b> |                                        |              |             |      |             |       |
| 3                                                                                      | Fator de alongamento 1- beta           | gi 134074101 | 23.220      | 4.61 | 18%         | 179   |
| 4                                                                                      | Fator de alongamento 1- beta           | gi 134074101 | 23.220      | 4.61 | 8%          | 177   |
| 5                                                                                      | Fator de iniciação                     | gi 134070207 | 17.983      | 4.83 | 15%         | 219   |
| 6                                                                                      | Fator de alongamento 1- beta           | gi 134074101 | 23.220      | 4.61 | 14%         | 84    |
| 7                                                                                      | Succinil coA sintetase                 | gi 134070355 | 31.151      | 9.15 | 5%          | 64    |
| 8                                                                                      | Proteína hipotética                    | gi 134066813 | 32.646      | 8.90 | 6%          | 107   |
| 9                                                                                      | Fator de alongamento 1- beta           | gi 134074101 | 23.220      | 4.61 | 18%         | 340   |

### 4.3. Análise imunoproteômica dos soros sanguíneos dos animais

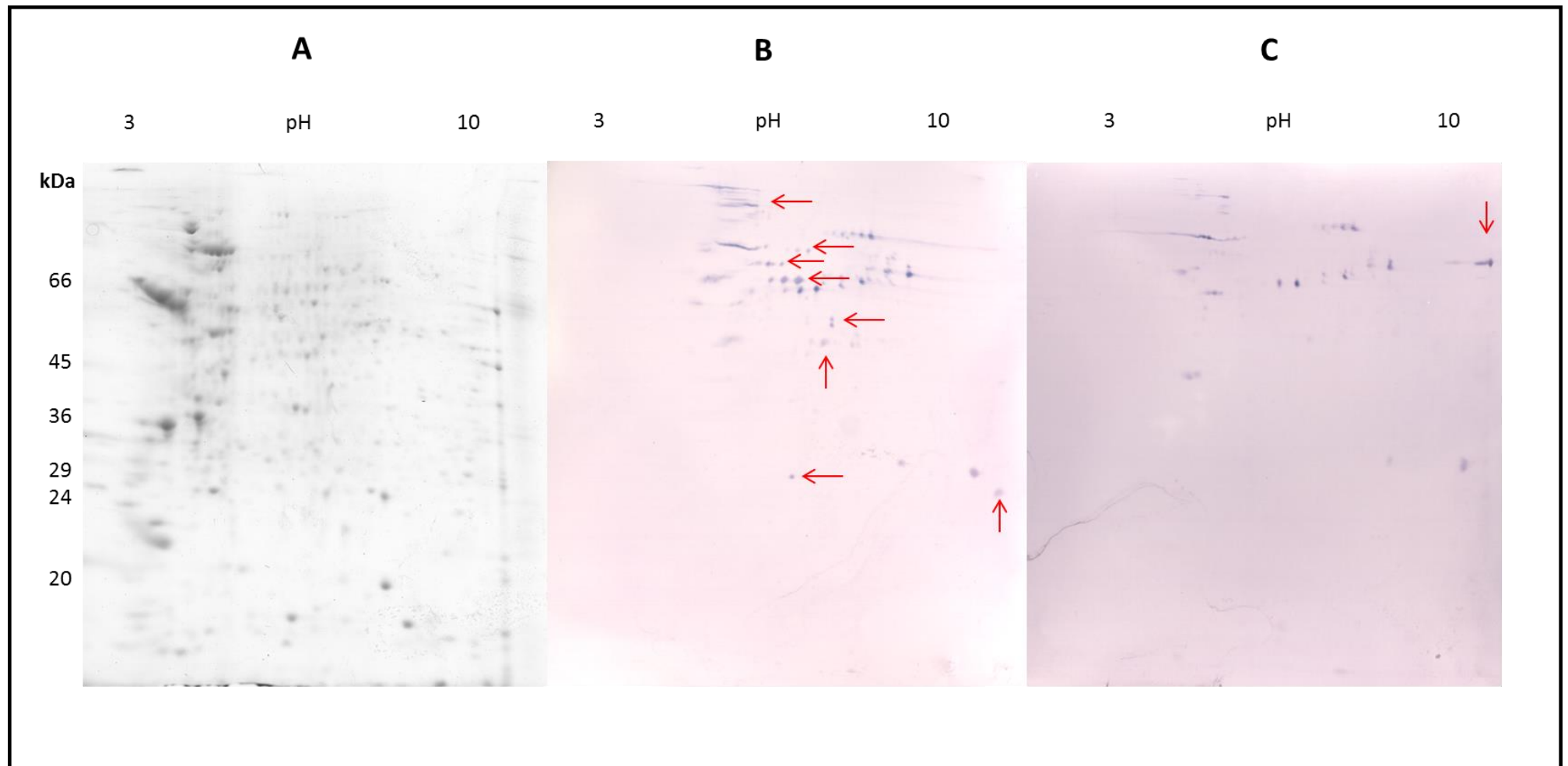
Tendo em vista o número relativamente baixo de diferenças observadas nos proteomas dos parasitos recuperados de camundongos normonutridos e desnutridos, uma segunda abordagem deste trabalho pretendeu analisar se a desnutrição proteica induziu alterações na resposta imune humoral de camundongos infectados. Para isto, soros dos animais de cada grupo foram utilizados para a detecção de proteínas reativas em experimentos de *Western Blotting*.

Primeiramente, visualizou-se o perfil de bandas reativas em gel unidimensional (**figura 9**), e, em seguida, foi realizada eletroforese bidimensional (SDS-Page, 7cm, pH 3-10) como mostrado na **figura 10**. A fim de identificar as proteínas do parasito envolvidas na indução da resposta imune humoral dos animais do grupo controle, foram confeccionados géis de poliacrilamida de 13 cm (12% SDS PAGE, pH 3-10, não-linear) com o intuito de aumentar a resolução do perfil proteico e facilitar a comparação posterior com o *immunoblotting*. Mesmo assim, a comparação entre as bandas reativas com os respectivos *spots* no gel réplica foi dificultada, o que se deve ao fato do sistema de detecção amplificar o sinal no *Western Blotting* por ação de atividade enzimática.

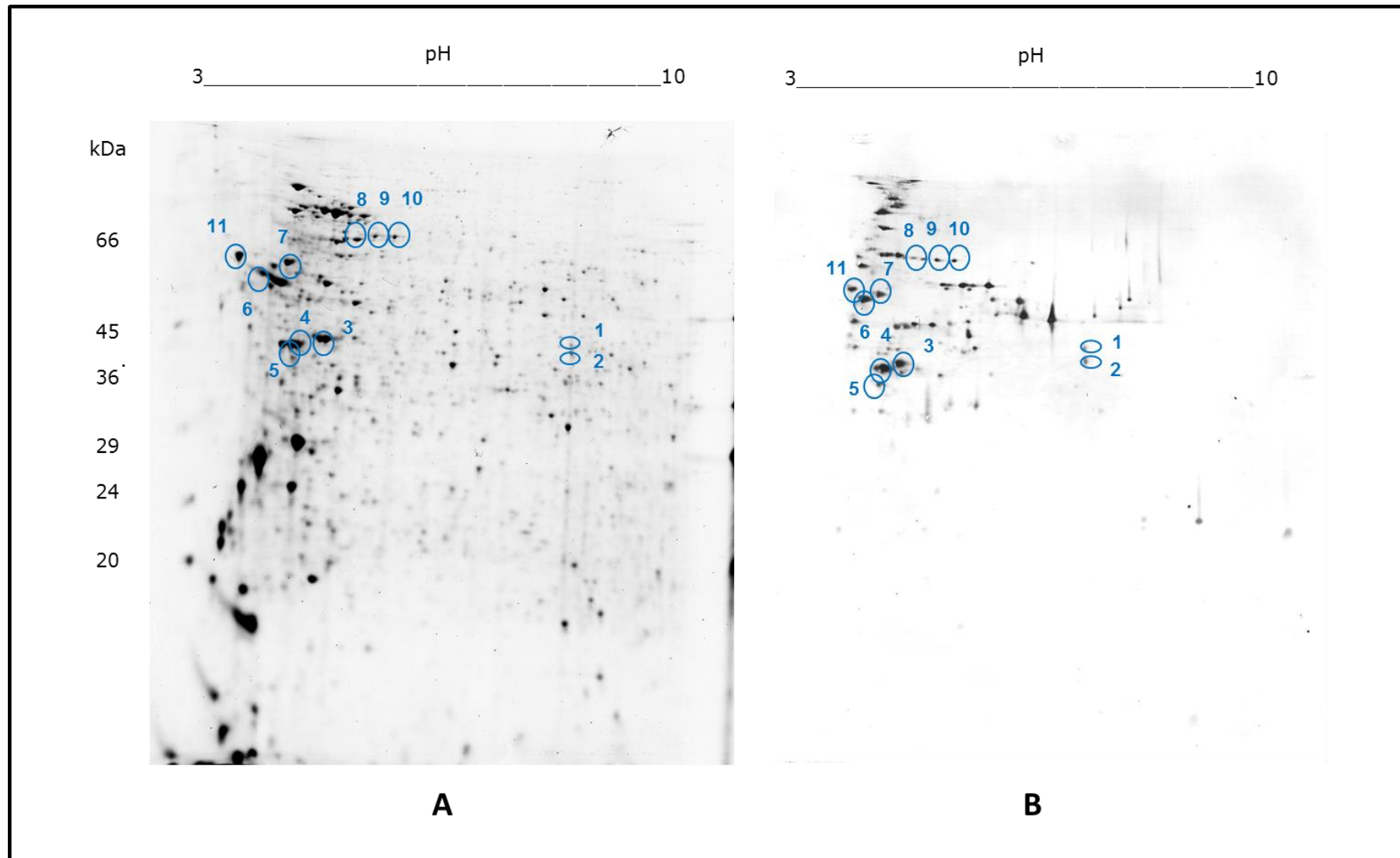
Os *spots* das proteínas reativas do grupo controle foram excisados conforme a **figura 11**, submetidos ao protocolo de digestão e identificados por espectrometria de massas (**tabela 4**). Dos 11 *spots* de interesse identificados no gel réplica, sete proteínas são chaperonas (*spots* 4,5, 7, 8, 9, 10, 11), uma está relacionada com a biossíntese de proteínas (*spot* 1) e duas tem função estrutural (*spots* 2 e 6).



**Figura 9: *Immunoblotting* unidimensional com extrato dos parasitos recuperados do grupo controle. R)** Gel Réplica corado com Coomassie Coloidal G-250 (Poliacrilamida, 12% SDS PAGE). **C)** *Immunoblotting* do soro dos animais do grupo controle (diluição 1:2000). **D)** *Immunoblotting* do soro dos animais do grupo desnutrido (diluição 1:2000). O anticorpo secundário utilizado foi IgG de cabra anti-camundongo marcado com fosfatase alcalina. Géis e *blottings* representativos de experimentos diferentes.



**Figura 10: Immunoblotting do soros dos grupos teste e controle. A)** Gel Réplica com extrato controle **B)** *Immunoblotting* do soro dos animais do grupo controle (diluição 1:400). **C)** *Immunoblotting* do soro dos animais do grupo teste (diluição 1:400). O anticorpo secundário utilizado foi IgG de cabra anti-camundongo marcado com fosfatase alcalina. As sequências de proteínas apontadas pelas setas vermelhas só foram reativas ao soro do grupo controle ou ao soro do grupo teste. Os géis confeccionados foram de poliacrilamida, 12% SDS PAGE, pH 3-10, 7 cm. Gel e *blottings* representativos de experimentos diferentes.



**Figura 11: Immunoblotting do soro do grupo controle. A)** Gel Réplica com extrato controle **B)** *Immunoblotting* do soro dos animais do grupo controle (diluição 1:2000). O anticorpo secundário utilizado foi IgG de cabra anti-camundongo marcado com fosfatase alcalina. Os spots reativos circulosados em azul na membrana correspondem aos do gel réplica, que foram excisados para identificação no espectrômetro de massas, Os géis confeccionados foram de poliacrilamida, 12% SDS PAGE, pH 3-10, 7 cm.

**Tabela 3:** Proteínas do parasito reativas ao soro do grupo controle, identificadas por espectrometria de massas.

| <b>Spot</b> | <b>Proteína</b>              | <b>Acesso</b> | <b>Massa (kDa)</b> | <b>pI</b> | <b>% cobertura</b> | <b>Score</b> |
|-------------|------------------------------|---------------|--------------------|-----------|--------------------|--------------|
| 1           | Fator de alongamento 2       | gi 134073957  | 94.942             | 5.77      | 1%                 | 53           |
| 2           | Beta tubulina                | gi 134067536  | 50.395             | 4.71      | 2%                 | 38           |
| 3           | 2,3- bifosfoglicerato mutase | gi 321398823  | 61.007             | 5.26      | 2%                 | 39           |
| 4           | Calreticulina                | gi 134071949  | 45.147             | 4.58      | 5%                 | 146          |
| 5           | HSP-83                       | gi 321398592  | 81.013             | 5.08      | 8%                 | 510          |
| 6           | Beta tubulina                | gi 134067536  | 50.395             | 4.71      | 3%                 | 62           |
| 7           | HSP                          | gi 321399298  | 92.644             | 5.24      | 3%                 | 121          |
| 8           | HSP-70                       | gi 134071457  | 69.317             | 6.0       | 8%                 | 118          |
| 9           | HSP-70                       | gi 134071458  | 72.089             | 5.90      | 5%                 | 123          |
| 10          | HSP-70                       | gi 134071457  | 69.317             | 6.0       | 18%                | 207          |
| 11          | Calreticulina                | gi 134071949  | 45.147             | 4.58      | 7%                 | 107          |

## **5- Discussão**



## 5. Discussão

O presente estudo teve como objetivo a realização de uma análise proteômica comparativa de cepas de *Leishmania (Leishmania) infantum* após a passagem por camundongos considerados normonutridos e desnutridos, bem como a avaliação da influência da desnutrição do hospedeiro vertebrado na resposta imune humoral contra proteínas do parasito por meio de técnicas de imunoproteômica. Concomitantemente, avaliou-se a carga parasitária no fígado e baço desses camundongos na fase crônica da infecção, e o crescimento *in vitro* dos promastigotas provenientes dos animais dos grupos teste e controle.

No início do experimento, o grupo teste recebeu dieta contendo 3% de proteína e o controle recebeu dieta contendo 14%. Para diagnosticar a desnutrição do grupo teste foram utilizados os parâmetros peso, a dosagem de proteínas totais e albumina do soro, e comparou-se ao grupo controle. É bem definido que, em humanos, o diagnóstico de DPC deve ser realizado a partir de uma análise dos sinais e sintomas clínicos, da antropometria e das dosagens bioquímicas (SCHURCH, 1995); justificando a adoção desses parâmetros no presente estudo.

O grupo desnutrido apresentou média de peso significativamente menor em relação ao controle durante todo o experimento. Conforme encontrado na literatura, uma significativa redução da massa corpórea decorrente da ingestão de dietas hipoproteicas é observada em estudos envolvendo modelos experimentais (OLIVEIRA *et al.*, 1999; ANSTEAD *et al.*, 2001; ALVES *et al.*, 2008; VITURI *et al.*, 2008). O tecido muscular esquelético é sensível à deficiência proteica, assim, quando a ingestão deste macronutriente é diminuída, ocorre uma perda significativa de massa muscular e, conseqüentemente, uma diminuição no peso corporal total (ALVES *et al.*, 2008). Além disso, conforme Vituri *et al* (2008), os animais alimentados com dietas hipoproteicas apresentam uma acentuada redução no consumo de ração, comportamento este que pode explicar, em parte, a diminuição da massa corpórea. É importante ressaltar que a diminuição no consumo da dieta também leva a um quadro de deficiência calórica e de micronutrientes, embora a dieta hipoproteica utilizada seja isocalórica e apresente concentrações adequadas de todos os micronutrientes em relação à dieta controle.

Assim como os resultados obtidos neste trabalho, vários estudos já demonstraram que a deficiência de proteínas na dieta leva à redução significativa dos níveis séricos de proteínas totais dos animais submetidos a essa condição (ABREU *et al.*, 2006; COUTO *et al.*, 2008). A utilização das proteínas séricas como instrumento de avaliação da desnutrição proteica é considerada um parâmetro importante e confiável (FONTOURA *et al.*, 2006). Proteínas plasmáticas podem oferecer informações importantes, que refletem o estado geral de um paciente, tanto no que diz respeito ao seu estado nutricional, quanto à gravidade de doenças condicionantes de um estado clínico crítico à sua saúde (HENRY, 1996; CHAVES, 1985). A síntese de proteínas hepática depende da disponibilidade de aminoácidos, e, assim, o indivíduo com privação de proteínas na dieta terá consequências negativas na biossíntese dessas macromoléculas (LOGAN & HILDEBRANT, 2003).

Da mesma forma, verificou-se neste estudo que os animais do grupo teste apresentaram concentrações séricas de albumina significativamente mais baixas do que as do grupo controle antes e depois da infecção ( $p < 0.05$ ). A albumina é a proteína plasmática mais abundante, correspondendo a quase 50% das proteínas totais do soro, é o indicador bioquímico de desnutrição mais utilizado. Dentre as funções da albumina pode-se destacar a participação na manutenção do volume plasmático circulante e do equilíbrio ácido básico e o transporte de uma ampla variedade de substâncias fisiológicas (FONTOURA *et al.*, 2006). Borelli *et al.* (2007) observaram que camundongos *Swiss* alimentados com dieta hipoproteica (4% de caseína) apresentaram níveis séricos de albumina significativamente menores que o grupo controle, em que foi administrada dieta contendo 20% de caseína. Já Serafim *et al.* (2010) relataram que houve uma diferença significativa entre os níveis de albumina de camundongos normonutridos e desnutridos (animais sob dieta contendo 3% de proteína e deficiente em zinco e ferro), porém não foi encontrada diferença significativa nos níveis de albumina entre os camundongos antes e depois da infecção com *L. chagasi*, corroborando com os resultados deste trabalho. Na LV humana, dados da literatura mostram que a hipoalbuminemia é frequentemente observada entre os pacientes sintomáticos (BOUREE *et al.*, 2000).

Com relação à quantificação de parasitos no baço e fígado dos animais, verificou-se um aumento significativo de parasitos no fígado do grupo desnutrido em relação ao controle ( $p < 0.05$ ) na fase crônica da doença, evidenciando uma resposta imunológica deficiente decorrente da desnutrição. O mesmo também foi verificado no trabalho de Serafim *et al* (2010), onde os camundongos do grupo desnutrido receberam dieta com o mesmo percentual de proteínas, mas deficiente em zinco e ferro. Anstead *et al* (2001), em um estudo envolvendo cepas de *L. donovani*, observaram que o aumento da visceralização do parasito foi influenciada pelo grau de desnutrição dos animais. Assim, os três grupos alimentados com dietas hipoproteicas (contendo 6%, 3% e 1% de proteína) apresentaram maior disseminação para o baço e, principalmente, para o fígado em relação ao grupo normonutrido em apenas três dias de infecção. O grupo que recebeu dieta com 1% de proteína apresentou maior percentual de visceralização comparado aos demais.

O aprimoramento das técnicas para identificação das proteínas e o desenvolvimento de métodos apropriados para lise e extração proteica de *Leishmania* spp. levaram à produção de vários mapas de proteínas destes parasitos (ACESTOR *et al.*, 2002). Utilizando a eletroforese bidimensional e os métodos de coloração com prata ou Coomassie Coloidal G-250, foram detectadas proteínas expressas por diferentes espécies de *Leishmania* spp. (GÓNGORRA *et al.*, 2003.; BROBEY *et al.*, 2006; CUERVO *et al.*, 2007). Proteínas expressas diferencialmente de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasito e produtos de excreção e secreção também têm sido alvos de investigação (EL FAKHRY *et al.*, 2002; BENTE *et al.*, 2003; NUGENT *et al.*, 2004; WALKER *et al.*, 2006; SILVERMAN *et al.*, 2011). Conforme relatado anteriormente, a associação entre a DPC e a LV ainda não foi investigada utilizando-se uma abordagem proteômica.

Conforme observado, os promastigotas recuperados dos animais do grupo desnutrido apresentaram crescimento *in vitro* diferencial quando comparados aos recuperados dos animais do grupo controle. Este fato estimulou uma análise bidimensional comparativa do perfil proteômico dos parasitos após a passagem pelos animais normonutridos e desnutridos, a fim de identificar possíveis alterações no proteoma de *L. infantum* influenciadas pelo estado nutricional do hospedeiro.

No geral, poucas alterações no proteoma dos promastigotas recuperados de animais dos grupos teste e controle foram verificadas, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença. Dentre as proteínas expressas diferencialmente entre os promastigotas provenientes do grupo desnutrido na fase aguda, podemos destacar a beta tubulina e as proteínas hipotéticas. As tubulinas representam proteínas altamente abundantes em *Leishmania*, sendo responsáveis pela formação de microtúbulos, dímeros de alfa e beta tubulina. Esses possuem um papel crucial na divisão celular, na manutenção da morfologia e motilidade, no deslocamento de vesículas e organelas, e na orientação do cinetoplasto (WERBOVETZ *et al.*, 1999; HAVENS *et al.*, 2000). As proteínas hipotéticas de *L. infantum* ainda não possuem função definida.

Na fase crônica da doença, os parasitos recuperados do grupo desnutrido apresentaram, principalmente, expressão diferencial de proteínas relacionadas com a biossíntese proteica, sendo elas: fator de alongamento 1-beta e fator de iniciação. A transformação da informação genética do DNA em proteínas funcionais é um processo complexo que envolve inúmeras moléculas e complexos proteicos participando dos processos de transcrição e tradução. Fatores de iniciação eucariótica (eIF2) desempenham um papel central na manutenção do que é geralmente considerado como um passo limitante na tradução do mRNA. O eIF2 se liga ao GTP e ao Met-iRNA e o transfere à subunidade 40S do ribossomo (KIMBALL, 1999). A fosforilação da menor subunidade de eIF2 (alfa) impede a formação do complexo eIF2-GTP-Met-iRNA e a síntese de proteínas. A fosforilação de eIF2-alfa ocorre sob uma variedade de condições, incluindo infecção viral, apoptose, privação de nutrientes, privação de ferro heme, e situações de *stress* (KIMBALL, 1999). O fator de alongamento polipeptídico eucariótico (EF1) não é somente o principal fator traducional, mas também uma das mais importantes proteínas multifuncionais, consistindo de 4 subunidades (alfa, beta, gama e delta). A subunidade alfa ligada ao GTP catalisa a reação da ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo. Já a EF1-beta catalisa a troca de GDP em GTP na subunidade alfa. Os fatores eucarióticos de alongamento têm sido ligados a vários processos celulares importantes, incluindo o controle traducional, transdução de sinal, organização do citoesqueleto, apoptose, e processos nucleares como a síntese de RNA e mitose (EJIRI, 2002).

É notável a diversidade entre os tipos de proteínas diferencialmente expressas pelos parasitos recuperados dos animais desnutridos nas fases aguda e crônica da infecção por *L. infantum*. Na fase aguda, grande parte das proteínas diferencialmente expressas estão relacionadas ao citoesqueleto, já na fase crônica elas estão relacionadas aos processos de biossíntese de proteínas. Este fato sugere que as condições do hospedeiro, como a DPC, e o tempo de infecção, podem influenciar na expressão diferencial de proteínas do parasito. A desnutrição do hospedeiro interfere diretamente na resposta imune do mesmo, assim, a proliferação do parasito é aumentada e, com isso, há também um aumento da expressão de proteínas relacionadas à síntese proteica pelo parasito.

Contudo, a identificação de proteínas diferencialmente expressas por *L. infantum* após a interferência da DPC ainda precisa ser aprofundada. Embora poucas alterações proteômicas tenham sido detectadas, isso não significa que não há um maior número de proteínas diferencialmente expressas. A utilização de outras abordagens como a utilização de géis com faixas distintas de ponto isoelétrico e maior poder de resolução, e a avaliação dos extratos proteicos a partir da proteômica *shotgun* (com a digestão das proteínas em solução e a análise comparativa dos constituintes proteicos obtidos) podem ser úteis para identificar as diferenças nos perfis proteômicos. É de particular interesse, a avaliação das alterações influenciadas pela DPC na forma amastigota do parasito, que é responsável pela infecção do sistema fagocítico mononuclear e o desenvolvimento da doença em si.

Como relatado anteriormente, o estado nutricional do animal define a resposta imune, ou seja, determina a capacidade metabólica celular e a eficiência com que a célula reage aos estímulos, iniciando e perpetuando o sistema de proteção e auto-reparação orgânicos (BRUNETTO *et al.*, 2007). Em resposta à infecção, o sistema imunológico inato é ativado primeiro, e, em seguida, são ativadas as funções da imunidade adquirida do hospedeiro. Ambos os processos envolvem ativação e proliferação de células imunes e síntese de um conjunto de moléculas que necessitam de replicação do DNA, expressão do RNA, e a síntese e secreção de proteínas, que requerem consumo de energia adicional (MALAFAIA *et al.*, 2009). Vários aspectos da imunidade inata são imprescindíveis para o combate à *Leishmania sp.*

Através de experimentos de *western blotting*, os dados deste trabalho sugerem que os camundongos desnutridos apresentam comprometimento na montagem de uma resposta imune humoral eficiente contra a infecção por *Leishmania infantum*. Os anticorpos envolvidos nesta resposta são drasticamente afetados pelas condições nutricionais do animal. Os mecanismos envolvidos na relação entre DPC e a resposta imunológica adaptativa são múltiplos. Dados da literatura demonstram que, em crianças desnutridas, há uma diminuição significativa nos linfócitos T funcionais. Caso a estrutura e função do timo sejam comprometidos, a resposta de células T de memória é reduzida (KEUSCH *et al.*, 2003; SAVINO *et al.*, 2002). Conforme Woodward *et al.* (1998), há uma involução dos órgãos linfoides decorrente da DPC, que acarreta em uma diminuição da imunocompetência adaptativa. No entanto, é importante salientar que os mecanismos afetados pela DPC na resposta imune adaptativa que podem aumentar a susceptibilidade aos parasitos do gênero *Leishmania* e influenciar na virulência dos mesmos ainda são pouco explorados (MALAFAIA *et al.*, 2009).

Dentre as proteínas do parasito reativas ao soro dos animais do grupo controle e identificadas através da técnica de *Western Blotting* no presente trabalho, quatro já foram consideradas antígenos imunogênicos em estudos proteômicos anteriores utilizando parasitos do gênero *Leishmania*. São elas a HSP-83 (GUPTA *et al.*, 2007; VERGNES *et al.*, 2007; BIYANI *et al.*, 2011; CHAWLA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2011), HSP-70 (DEA-AYUELA *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2007 ; BIYANI *et al.*, 2011; CHAWLA *et al.*, 2011; WALKER *et al.*, 2012) a calreticulina (GUPTA *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2012) e o fator de alongamento 2 (FORGBER *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2007; CHAWLA *et al.*, 2011; WALKER *et al.*, 2012).

HSP's são um conjunto de proteínas altamente conservadas que participam de uma grande diversidade de vias bioquímicas e imunológicas, comportando-se como chaperonas e antígenos imunodominantes, além de estarem envolvidas em vias de processamento de antígenos (GUPTA *et al.*, 2007). HSP-70 e HSP-83, expressas no gênero *Leishmania*, potencializam a resposta das células Th1 do hospedeiro vertebrado e têm sido reconhecidas como fatores imunogênicos importantes no curso da infecção, constituindo alvos de pesquisas que envolvem a busca por novas preparações e adjuvantes

para vacinas (ANGEL *et al.*, 1996; DEA-AYUELA *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2012). Nas condições experimentais empregadas neste estudo, não houve reatividade do soro do grupo de camundongos desnutridos a esse conjunto de proteínas. Este fato evidencia, ainda mais, a deficiência da resposta imune decorrente da ingestão da dieta hipoproteica, bem como a importância do reconhecimento dos antígenos do parasito pelo hospedeiro para o controle da infecção.

Outras proteínas importantes identificadas através da imunoproteômica consideradas antígenos imunogênicos foram a calreticulina e o fator de alongamento 2. A calreticulina é uma proteína multifuncional, pois está envolvida na captação de  $Ca^{2+}$ , enovelamento de proteínas, apoptose e vias de sinalização celular (HARR & DISTELHORST, 2010). No parasito, a alteração da função desta proteína pode afetar o direcionamento de outras proteínas secretadas que estão associadas à virulência (GUPTA *et al.*, 2007). O fator de alongamento 2 é expresso tanto na fase promastigota quanto na fase amastigota do parasito (FORGBER *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2007; WALKER *et al.*, 2012). Juntamente com o fator de alongamento 1 alfa e duas GTPases, conduz o ciclo de alongação da síntese proteica. É membro da superfamília de proteínas G, e sofre mudanças conformacionais associadas com a ligação do nucleotídeo de guanosina e hidrólise de GTP (KAUL *et al.*, 2011). Esse fator tem a capacidade de induzir uma resposta proliferativa das células T do hospedeiro, controlando a infecção e gerando uma imunidade persistente contra *Leishmania* (PROBST *et al.*, 2001). A beta tubulina também foi identificada no ensaio de *immunoblotting*. Essa proteína também é considerada alvo para o diagnóstico ou vacina para leishmaniose em alguns estudos (COELHO *et al.*, 2012)

Vale ressaltar a dificuldade em correlacionar o *spot* reativo na membrana com o respectivo *spot* no gel réplica, devido à amplificação do sinal produzida durante a revelação do *Western Blotting*. Esse fato impediu a identificação dos *spots* reativos ao soro dos animais do grupo controle em sua totalidade.

## **6- Conclusão**



## **6. Conclusão**

Assim, com base nos resultados obtidos, o presente trabalho sugere que a DPC pode influenciar na carga parasitária do hospedeiro, na expressão diferencial de proteínas pelo parasito, e na resposta imune humoral do hospedeiro frente à infecção por *L. infantum*.

## **7- Referências Bibliográficas**

## 7. Referências Bibliográficas

ABREU, M. A. M. M.; WECKX, L.L.M.; HIRATA, C.H. W. Histological and ultrastructural aspects of the tongue in undernourished rats. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, p.523-527, 2006.

ACESTOR, N.; MASINA, S.; WALKER, J.; *et al.* Establishing two-dimensional gels for the analysis of *Leishmania* proteomes. **Proteomics**, v. 7, p.877–879, 2002.

ALEXANDRE SÉRGIO DA COSTA, B.; ANTONIO CARLOS DE CASTRO TOLEDO, J.; ANA, R. Factors of poor prognosis of visceral leishmaniasis among children under 12 years of age. A retrospective monocentric study in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, 2001-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, 2013.

ALVAR, J. *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 2, p. 334, 2008.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; GUTIERREZ-SOLAR..., B. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical Microbiology ...**, 1997.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, 2012.

ALVES, A.; DAMASO, A.; DAL-PAI, V. Efeito da desnutrição proteica pré e pós-natal sobre a morfologia, a diferenciação e o metabolismo do tecido muscular estriado esquelético de ratos. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v. 84, p. 264-271, 2008.

ANDERSON, N.; MATHESON, A.; STEINER, S. Proteomics: applications in basic and applied biology. **Current Opinion in Biotechnology**, 2000.

ANGEL, S.; REQUENA, J.; SOTO, M.; CRIADO, D.; ALONSO, C. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. **Acta tropica**, v. 62, p. 45-56, 1996.

ANSTEAD, G.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO..., W. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infection and ...**, 2001.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 109-118, 2012.

AYALEW, S. et al. Immunoproteomic analyses of outer membrane proteins of *Mannheimia haemolytica* and identification of potential vaccine candidates. **Proteomics**, v. 10, n. 11, p. 2151-2164, 2010.

BADARÓ, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 154, n. 4, p. 639-649, 1986.

BAINES, M.; SHENKIN, A. Lack of effectiveness of short-term intravenous micronutrient nutrition in restoring plasma antioxidant status after surgery. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 21, n. 2, p. 145-150, 2002.

BATES, P. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

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

BERN, C.; MAGUIRE, J.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 10, 2008.

BHASKARAM, P. Micronutrient malnutrition, infection, and immunity: an overview. **Nutrition reviews**, v. 60, n. 5 Pt 2, p. 5, 2002.

BIYANI, N.; SINGH, A.; MANDAL, S.; et al. Differential expression of proteins in antimony- susceptible and –resistant isolates of *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 179, p. 91–99, 2011.

BOELAERT, M. et al. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 1, p. 32-40, 2008.

BORELLI, P. *et al.* Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. **Journal of Nutrition**, v. 97, p. 307-314, 2007.

BOUREE, P.; BOTTEREL, F.; LANCON, A. Study of protein profile in the visceral leishmaniasis. **J Egypt Soc Parasitol**, v. 30, p. 885-893, 2000.

BROBEY, R.K.; MEI, F.C.; CHENG, X.; *et al.* Comparative two-dimensional electrophoresis maps of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* braz. **Journal Infect Diseases**, v. 10, p. 1–6, 2006.

BRUNETTO, M.; GOMES, M.; JEREMIAS..., J. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. **Acta Scien ...**, 2007.

CALDER, P. Feeding the immune system. **The Proceedings of the Nutrition Society**, p. 1-11, 2013.

CALDER, P.; JACKSON, A. Undernutrition, infection and immune function. **Nutrition research reviews**, 2000.

CHANDRA, R. Protein-energy malnutrition and immunological responses. **The Journal of nutrition**, v. 122, n. 3 Suppl, p. 597-600, 1992.

CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 5, p. 2975-2984, 1994.

CHAVES, N. Nutrição Básica e aplicada. **Rio de Janeiro: Guanabara**, 2<sup>a</sup> ed., 1985.

CHAWLA, B.; JHINGRAM, A.; PANIGRAHI, A.; *et al.* Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin-susceptible -resistant *Leishmania donovani*. **PLoS One**, v. 6, p. 660, 2011.

COELHO, V. *et al.* Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 1, 2012.

COSTA, C. *et al.* Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 99, n. 3, p. 229-236, 2005.

COSTA, M.; ANDRADE, H.; BARTHOLOMEU, D.; et al. 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. **Journal of Proteomics**, v. 10, p. 2172–2184, 2011.

COUTINHO, J.; GENTIL, P.; TORAL, N. [Malnutrition and obesity in Brazil: dealing with the problem through a unified nutritional agenda]. **Cadernos de saúde pública**, v. 24 Suppl 2, p. 40, 2008.

COUTO, J.; VIEIRA, R.; BARBOSA, J.; MACHADO, S.; FERREIRA, H. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 390-393, 2008.

CUERVO, P. et al. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 1, p. 79-92, 2009.

CUERVO, P.; DOMONT, G.; DE JESUS, J. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 5, p. 845-867, 2010.

DEA-AYUELA, M.; RAMA-IÑIGUEZ, S.; BÓLAS-FERNANDÉZ, F. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. **Proteomics**, v. 6, p. 4187–4194, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DIEFENBACH, A. et al. Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. **Science**, v. 284, n. 5416, p. 951-955, 1999.

DOUMAS, B. T., WATSON, W. A., BIGGS, H. G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clin. Chim. Acta**, v. 31, n. 87, p. 21-30, 1971.

DRUMMELSMITH, J. et al. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 2, n. 3, p. 146-155, 2003.

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

EJIRI, S. Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, p. 1-21, 2002.

FONTOURA, C.S.M.; CRUZ, D.O.; LONDERO, L.G.; VIEIRA, R.M. Avaliação nutricional de paciente crítico. **Rev Bras Ter Int**, v. 18, p. 298-306, 2006.

FORGBER, M. et al. Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology. **PloS one**, v. 1, 2006.

FRADE, A. et al. TGFB1 and IL8 gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 11, n. 5, p. 912-916, 2011.

GOMES, R. et al. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 22, p. 7845-7850, 2008.

GÓNGORRA, R.; ACESTOR, N.; QUADRONI, M.; et al. Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional electrophoresis polyacrilamide gel electrophoresis and associated technologies. **Biomedica**, v. 23, p.153–160, 2003.

GONTIJO, C.; MELO, M. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev bras epidemiol**, 2004.

GUERIN, P. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

GUPTA, S., SISODIA, B., SINHA, S.; et al. Proteomic approach for identification and characterization of novel immunostimulatory proteins from soluble antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. **Proteomics**, v. 7, p. 816–823, 2007.

HARR, M. & DISTELHORST, C. Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 185-190, 2010.

HAVENS, C., BRYANT, N., ASHER, L., LAMOREAUX, L., PERFETTO, S., BRENDLE, J., WERBOVETZ, K. Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *L. donovani*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 110, p. 223-236, 2000.

HENRY, J. B. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. **New York: WB Saunders Company**, 19<sup>a</sup> ed., 1996.

HERWALDT, B. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

HUGHES, S.; KELLY, P. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. **Parasite immunology**, v. 28, n. 11, p. 577-588, 2006.

IVENS, A. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, 2005.

JASON, J.; ARCHIBALD, L.; NWANYANWU..., O. Vitamin A levels and immunity in humans. **Clinical and ...**, 2002.

KARPLUS, T. et al. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6919-6925, 2002.

KAUL, G.; PATTAN, G.; RAFEEQUI, T. Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. **Cell biochemistry and function**, v. 29, p. 227-234, 2011.

KEUSCH, G. et al. Immature circulating lymphocytes in severely malnourished guatemalan children. **Journal Pediatr Gastroenterol Nut**, v. 6, p. 265-270, 1987.

KIMBALL, S. Eukaryotic initiation factor eIF2. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 25-29, 1999.



KUBAR, J. et al. Visceral leishmaniasis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4+ T-lymphocyte counts. **AIDS**, 1998.

LI, P. et al. Amino acids and immune function. **The British journal of nutrition**, v. 98, n. 2, p. 237-252, 2007.

LOGAN, S.; HILDEBRANT, L.A. The use of prealbumin to enhance nutrition-intervention screening and monitoring of the malnourished patient. **Nutrition Today**, v. 38, p. 134-135, 2003.

MACIEL, B. et al. Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med ...**, 2008.

MAIA, C. et al. Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 6, 2011.

MALAFAIA, G. Protein-energy malnutrition as a risk factor for visceral leishmaniasis: a review. **Parasite immunology**, v. 31, n. 10, p. 587-596, 2009.

MALAFAIA, G. et al. Protein-energy malnutrition decreases immune response to *Leishmania chagasi* vaccine in BALB/c mice. **Parasite immunology**, v. 31, n. 1, p. 41-49, 2009.

MAURICIO, I. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119 ( Pt 3), p. 237-246, 1999.

MCCALL, L.-I.; MATLASHEWSKI, G. Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. **Molecular microbiology**, v. 77, n. 2, p. 518-530, 2010.

MCCALL, L.-I.; ZHANG, W.-W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 1, 2013.

MOHAMED, H. et al. Genetic susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan: linkage and association with IL4 and IFNGR1. **Genes and immunity**, v. 4, n. 5, p. 351-355, 2003.

MONTEIRO, C. A.; CONDE, W. L.; KONNO, S. C. Análise do inquérito "Chamada Nutricional 2005" realizado pelo Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome e Ministério da Saúde. **São Paulo: Núcleo de**

**Pesquisas Epidemiológicas em Nutrição e Saúde, Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2006.**

MÜLLER, I. et al. Age-related alteration of arginase activity impacts on severity of leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 5, 2008.

MURRAY, H. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NIRUJOGI, R. et al. Moving from unsequenced to sequenced genome: Reanalysis of the proteome of *Leishmania donovani*. **Journal of proteomics**, 2013.

NUGENT, P.G.; KARSANI, S.A.; WAIT, R.; et al. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. **Mol Biochem Parasitol**, v.136, p. 51–62, 2004.

OLIVEIRA, F. L.; OLIVEIRA, A. S.; SCHIMIDT, B.; AMANCIO, O. M. Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações musculo-esqueléticas na 1º e 2º gerações. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v. 75, p. 350-356, 1999.

PAAPE, D.; AEBISCHER, T. Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1614-1624, 2011.

PATTERSON, S.; AEBERSOLD, R. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature genetics**, v. 33 Suppl, p. 311-323, 2003.

PEACOCK, C. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature genetics**, v. 39, n. 7, p. 839-847, 2007.

PEARSON, R. et al. Visceral leishmaniasis: a model for infection-induced cachexia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 47, n. 1 Pt 2, p. 8-15, 1992.

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. **Immunological reviews**, v. 213, p. 159-179, 2006.

PETRELA, R. et al. Pediatric visceral leishmaniasis in Albania: a retrospective analysis of 1,210 consecutive hospitalized patients (1995-2009). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 9, 2010.

PISCOPO, T. V.; AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 83, 2007.

PROBST, P.; STROMBERG, E.; HASHIM, W.; et al. Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from Leishmania by CD4 T cell expression cloning. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 498-505, 2001.

ROHOUSOVÁ, I. et al. Salivary gland transcriptomes and proteomes of Phlebotomus tobbi and Phlebotomus sergenti, vectors of leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 5, 2012.

RUKMANGADACHAR, L. et al. Two-dimensional difference gel electrophoresis (DIGE) analysis of sera from visceral leishmaniasis patients. **Clinical proteomics**, v. 8, n. 1, p. 4, 2011.

SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S.; HANDMAN, E. The role of host genetics in leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 25, n. 8, p. 383-391, 2009.

SARKAR, A. et al. Leishmania strains causing self-healing cutaneous leishmaniasis have greater susceptibility towards oxidative stress. **Free radical research**, v. 46, n. 5, p. 665-673, 2012.

SAVINO, W. et al. The thymus gland: a target organ for growth hormone. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, n. 5, p. 442-252, 2002.

SCHAIBLE, U.; KAUFMANN, S. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. **PLoS medicine**, v. 4, n. 5, 2007.

SCHURCH, B. Malnutrition and behavioral development: The nutrition variable. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 2255-2262, 1995.

SCOTT, P. Impaired macrophage leishmanicidal activity at cutaneous temperature. **Parasite immunology**, v. 7, n. 3, p. 277-288, 1985.

SEAMAN, J.; MERCER, A.; SONDORP..., H. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. **Annals of internal ...**, 1996.

SERAFIM, T.; MALAFAIA, G.; SILVA..., M. Immune response to Leishmania (Leishmania) chagasi infection is reduced in malnourished BALB/c mice. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2010.

SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R. Post-genomic vaccine development. **FEBS letters**, v. 580, n. 12, p. 2985-2992, 2006.

SILVA, E.; GONTIJO, C.; PACHECO..., R. Visceral leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2001.

SILVERMAN, J. et al. Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani. **Genome biology**, v. 9, n. 2, 2008.

SILVERMAN, J. et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages. **Journal of cell science**, v. 123, n. Pt 6, p. 842-852, 2010.

SINGH, N. et al. Age-influenced population kinetics and immunological responses of Leishmania donovani in hamsters. **Parasitology research**, v. 101, n. 4, p. 919-924, 2007.

SINGH, O. et al. Reassessment of immune correlates in human visceral leishmaniasis as defined by cytokine release in whole blood. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 19, n. 6, p. 961-966, 2012.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p. 1-6, 2011.

STANLEY, A.; ENGWERDA, C. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 138-147, 2007.

STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2004.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TAYLOR, C.; HIGGS, E. Micronutrients and infectious diseases: thoughts on integration of mechanistic approaches into micronutrient research. **The Journal of infectious diseases**, v. 182 Suppl 1, p. 4, 2000.

TITUS, R.; RIBEIRO, J. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, 1988.

UAUY, R.; MONTEIRO, C. The challenge of improving food and nutrition in Latin America. **Food & Nutrition Bulletin**, 2004.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

VERGNES, B.; GOURBAL, B.; GIRARD, I.; et al. 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**, v. 6, p. 88–101, 2007.

VERMA, S. et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **PloS one**, v. 5, n. 4, 2010.

VINHAS, V. et al. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. **European journal of immunology**, v. 37, n. 11, p. 3111-3121, 2007.

VITURI, C. L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; BORELLI, P. Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir a proliferação de células mielóides *in vitro* no modelo de denutrição proteica em camundongos. **Brazilian Journal Pharma Science**, v. 44, p. 493-500, 2008.

WALKER, J.; VASQUEZ, J.J.; GOMEZ, M.A.; et al. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 147, p. 64–73, 2006.

WARBURG, A. et al. Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 345, n. 1312, p. 223-230, 1994.

WERBOVETZ, K. A., BRENDLE, J. J., SACKETT, D. L. Purification, characterization, and drug susceptibility of tubulin from *Leishmania*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 98, p. 53-65, 1999.

WERNECK, G. et al. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiology and infection**, v. 135, n. 2, p. 195-201, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Magnitude of the problem, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the Leishmaniasis, 2010

WILKINS, M. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Bio/technology (Nature Publishing Company)**, v. 14, n. 1, p. 61-65, 1996.

WILLIAMS, J. et al. Immunoproteomic analysis of the development of natural immunity in subjects colonized by *Neisseria meningitidis* reveals potential vaccine candidates. **Infection and immunity**, v. 77, n. 11, p. 5080-5089, 2009.

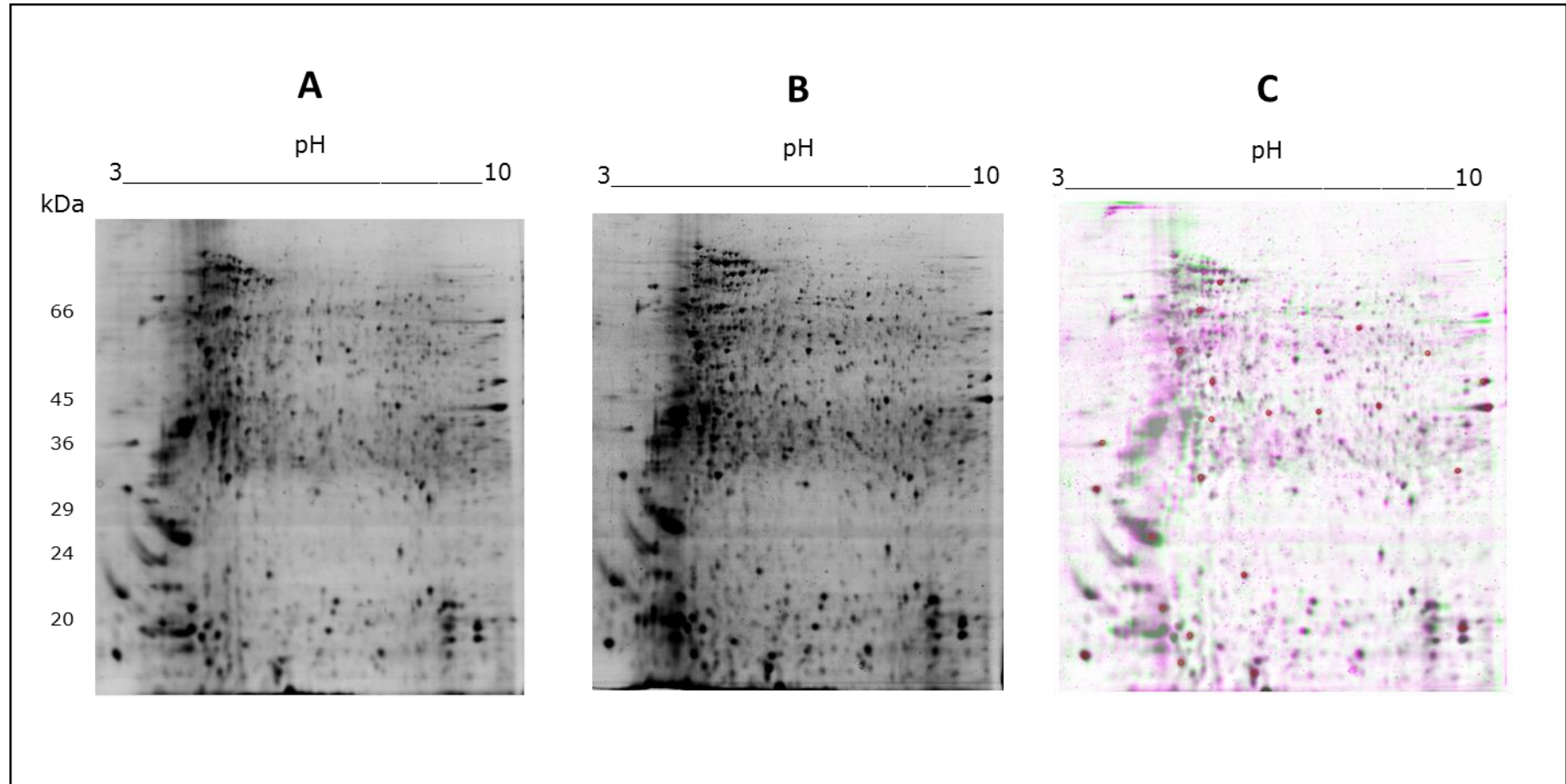
YOUSSEF EL, F.; MARC, O.; BARBARA, P. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. **PROTEOMICS**, v. 2, 2002.

ZHANG, W.-W. et al. Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 37, p. 35508-35515, 2003.

ZHU, Y.-Z. et al. Immunoproteomic analysis of human serological antibody responses to vaccination with whole-cell pertussis vaccine (WCV). **PloS one**, v. 5, n. 11, 2010.

## **8- Anexos**

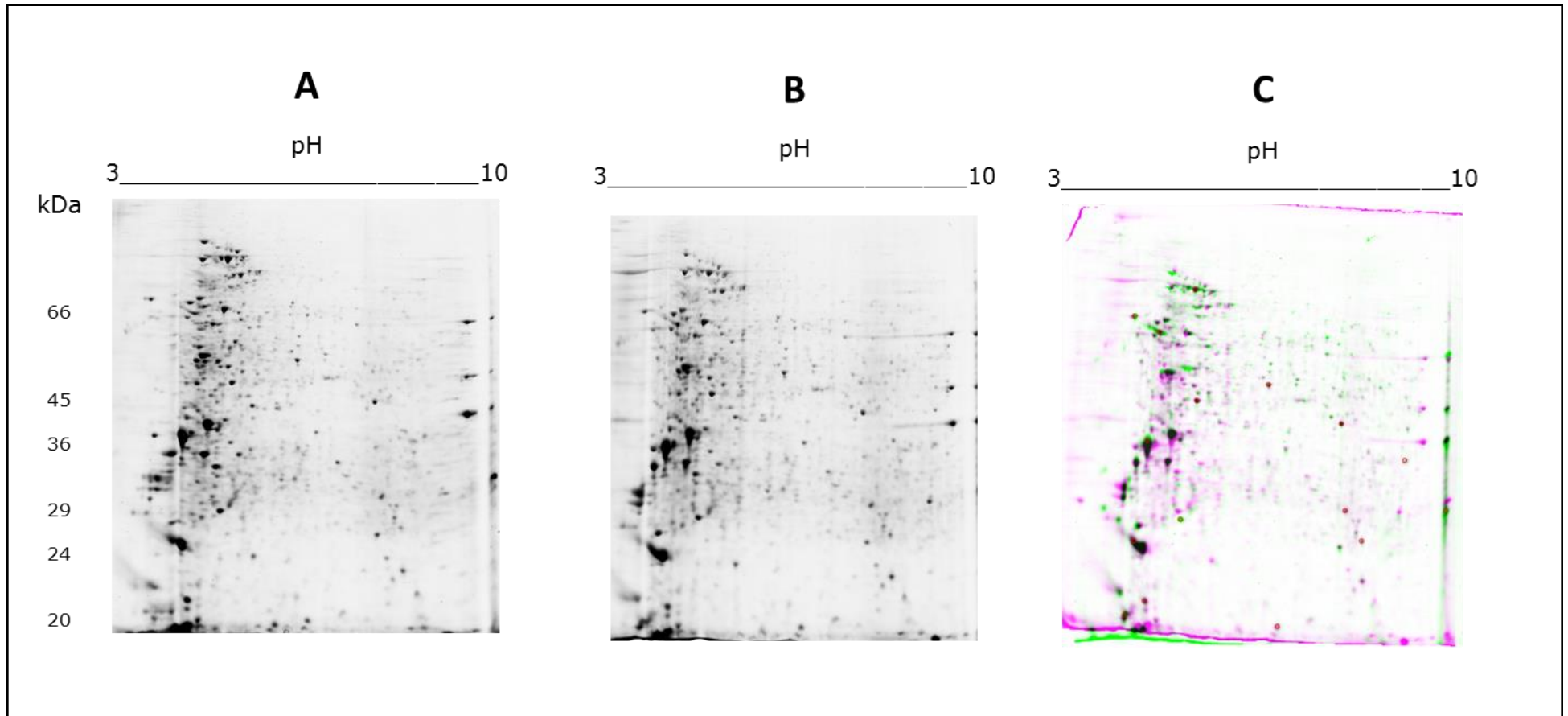
## Figura Suplementar 1



Análise através do *software* LUDESI REDFIN 3 dos géis bidimensionais representativos do proteoma de *L. infantum* recuperados dos animais dos grupos controle e teste na fase aguda doença. **A)** Grupo controle (verde) **B)** Grupo teste (rosa) **C)** Sobreposição. Géis de poliacrilamida, 12% SDS-Page. Os *spots* em preto indicam proteínas comuns nos dois extratos.



## Figura Suplementar 2



Análise através do software LUDESI REDFIN 3 dos géis bidimensionais representativos do proteoma de *L. infantum* recuperados dos animais dos grupos controle e teste na fase crônica doença. **A)** Grupo controle (verde) **B)** Grupo teste (rosa) **C)** Sobreposição. Géis de poliacrilamida, 12% SDS-Page. Os spots em preto indicam proteínas comuns nos dois extratos.