



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Avaliação do perfil de expressão gênica de promastigotas em cultura axênica de cepas de *L. infantum* de pacientes com doença grave e não grave.

Valéria Claudiane Simeão Oliveira

Teresina - PI

2016

Valéria Claudiane Simeão Oliveira

Avaliação do perfil de expressão gênica de promastigotas em cultura axênica de cepas de *L. infantum* de pacientes com doença grave e não grave

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde da REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa

Co-orientador: Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: VALÉRIA CLAUDIANE SIMEÃO OLIVEIRA

TÍTULO DO PROJETO: “Avaliação do perfil de expressão gênica de promastigotas em cultura axênica de cepas de *L. infantum* de pacientes com doença grave e não grave.”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa, UFPI (Presidente)	<u>satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima, UESPI (Examinador)	<u>satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Profa. Dra. Clarissa Romero Teixeira - FIOCRUZ (Examinadora)	<u>satisfatório</u>	<u>Clarissa Teixeira</u>
Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino – UFPE (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Vladimir Costa Silva - UFPI (Examinador)	<u>satisfatório</u>	<u>Vladimir Costa Silva</u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 25 de maio de 2016.

HORÁRIO: 08h30min

LOCAL: Auditório do Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella.

Dedico este trabalho aos meus grandes amores:

Marco Polo e Catharina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos recebidas.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa**, por acreditar, possibilitar e me incentivar na concretização deste sonho.

O meu eterno agradecimento ao meu co-orientador, **Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes**, que sempre me apoiou e me incentivou no campo da pesquisa.

Em especial, agradeço ao **Dr. Vladimir Costa**, a quem eu sempre no meu desespero recorri. Muito obrigada pela amizade, incentivo e sugestões.

À **Profa. Dra. Dorcas Lamounier Costa**, pelos dados clínicos dos seus pacientes.

Ao **Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino**, **Prof. Dr. Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior** e ao colega **Raul Maia Falcão** pela análise e compilação dos dados.

Aos colegas e técnicos do Laboratório (IDTNP), **Débora Braz**, **Adeno**, **Adelino**, **Daniela Zacarias**, **Jahilton Silva**, **Alexandre Silva** e **Teresinha** pela força, amizade e ajuda nos momentos decisivos.

À **Universidade Federal do Piauí** e ao **Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella**, pela oportunidade e pelas portas abertas para o mundo da pesquisa.

Ao **Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida – LaCTAD/UNICAMP** pela presteza do serviço.

Á minha **família** e **amigos** que muitas vezes tive que me ausentar do convívio para concretizar este sonho. Muito obrigada pelo incentivo, carinho e compreensão.

Ao meu esposo e companheiro, **Marco Polo**, por todo o seu estímulo, vibração, otimismo, apoio e compreensão. Sem você não conseguiria. Muito obrigada.

E finalmente á minha pequena **Catharina**, que muitas vezes não pude lhe dar atenção e o meu colo. Amo você filha.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é causada pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* e clinicamente, a doença apresenta desfechos variáveis, cursando da forma assintomática à doença grave e fatal, principalmente se não for tratada. A febre, perda de peso, pancitopenia e hepatoesplenomegalia constituem os principais sintomas desta síndrome. Vários fatores relacionados com o hospedeiro e o parasita são considerados importantes para o estabelecimento da doença. Na *Leishmania*, os fatores de virulência destacam-se como meios que facilitam a permissividade da invasão e o crescimento destes organismos nos hospedeiros. Muitos genes da *Leishmania* estão associados com esses fatores de virulência e atualmente existem diversas tecnologias que permitem o sequenciamento dos genes do DNA em larga escala. A técnica de RNA-Seq, através da plataforma Illumina HiSeq2500, foi utilizada para sequenciar um total de 20 amostras de promastigotas de *Leishmania infantum* de pacientes previamente classificados como grave e não grave. Os dados do sequenciamento foram analisados por ferramentas de bioinformática e 8364 transcritos foram mapeados no genoma de referência (*L. infantum* JPCM5). A análise de expressão diferencial entre os grupos grave e não grave mostrou uma baixa correlação da expressão diferencial entre os genes dos grupos, porém o grupo grave expressou 3 genes (Linj.28.29.50; Linj. 151240 e o Linj.23.rRNA1) diferentes e upregulados que não foram expressos no grupo não grave. Já o grupo não grave expressou 50 genes upregulados. Neste trabalho foram identificados e anotados genes upregulados expressados tanto no grupo grave quanto no grupo não grave. O gene Hsp 70 (LinJ. 28.29.50) e o gene transportador de nucleosídeo (LinJ. 151240) foram fortemente expressos, no grupo grave. Vários desses genes expressos, já são discutidos como possíveis fatores de virulência e de resistência a drogas leishmanicidas. Estudos futuros serão necessários para uma análise mais ampliada da correlação entre esses genes e o desenvolvimento da LV, contribuindo com o conhecimento sobre a patogênese desta doença e gerando meios para o desenvolvimento de estratégias que intervenham no processo infeccioso e auxiliem no controle e erradicação desta doença.

Palavras chave: Leishmaniose visceral, *Leishmania infantum*, Fatores de virulência, RNA-Seq, Expressão de gene.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is caused by *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* and clinically, the disease presents variable outcomes, asymptomatic to severe and deadly disease, especially if left untreated. The fever, weight loss, pancytopenia and hepatosplenomegaly are the main symptoms of this syndrome. Many factors related to host and parasite are considered important for the establishment of the disease. In *Leishmania*, the virulence factors highlight as means that make ease the permissiveness of invasion and the growth of these organisms in hosts. Many *Leishmania* genes are associated with these virulence factors and there are currently several technologies that allow the sequencing of DNA genes on a large scale. The technique of RNA-Seq, through the Illumina HiSeq2500 platform, was used to sequence a total of 20 samples of promastigotes of *Leishmania infantum* from patients previously classified as severe and non-severe. Sequencing data were analyzed by bioinformatics tools and 8364 transcripts were mapped into the genome of reference (*L. infantum* JPCM5). The analysis of differential expression between the severe and non-severe groups, showed off a low correlation of the differential expression between the genes groups, but the severe group expressed 3 genes (LinJ.28.2950, LinJ.15.1240 and LinJ.23.rRNA1) different and upregulated that were not expressed in the non-severe group. Also, the non-severe group expressed 50 upregulated genes. In this work, it was identified and wrote down upregulated genes expressed as in the severe group as in the non-severe group. The Hsp 70 gene (LinJ. 28.2950) and the nucleoside transporter gene (LinJ.15.1240) were strongly expressed in the severe group. Many of these genes expressed, are already discussed as possible virulence factors and resistance to leishmanial drugs. Future studies will be needed for a more expanded analysis of the correlation between these genes and the development of VL, contributing to the knowledge about the pathogenesis of this disease and generating means for the development of strategies that intervene in the infectious process and assist in the control and eradication of this disease.

Keywords: Visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, Virulence factors, RNA-Seq, Gene Expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (Introdução)	Ciclo de vida da <i>Leishmania sp</i>	139
Figura 2 (Revisão da literatura)	Paciente com hepatoesplenomegalia causada pela leishmaniose visceral	140
Figura 3 (Revisão da literatura)	Esquema da transcrição e processamento de mRNA em Tripanossomatídeos	141
Figura 1 (Artigo 1)	Curva básica de enquadramento danos-resposta da patogênese microbiana	96
Figura 1 (Artigo 2)	Representação do total das reads counts por amostra	131
Figura 2 (Artigo 2)	Representação das reads mapeados nos genes de cada amostra	131
Figura 3 (Artigo 2)	Plot de densidade da distribuição dos valores do FPKM dos genes dos grupos graves e não graves.	132
Figura 4 (Artigo 2)	Volcano Plot da dispersão da expressão diferencial dos genes dos grupos graves e não graves.	133
Figura 5 (Artigo 2)	Gráfico da descrição da diferença de expressão do gene HSP70 pelo Fold Change.	134
Figura 6 (Artigo 2)	Gráfico de expressão diferencial do gene HSP70 entre grupos grave e não grave.	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Artigo 1)	Fatores de virulência estudados em espécies de <i>Leishmanias</i> .	97
Tabela 1 (Artigo 2)	Classificação dos pacientes com leishmaniose visceral	129
Tabela 2 (Artigo 2)	Número das Reads gerados por amostra	130
Tabela 3 (Artigo 2)	Os 50 genes diferencialmente expressos no grupo não grave em relação ao grupo grave ($FC \geq 1,5$)	135
Tabela 4 (Artigo 2)	Genes diferencialmente expressos no grupo grave classificado pelo Fold Change ($FC < -1,5$) ou ($FC \geq 1,5$)	138

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2D-DIGE	Eletroforese bidimensional em gel diferencial
AcP	Proteína fostatase ácida (<i>acid phosphatase</i>)
BiP	Proteína ligada ao retículo endoplasmático
CAGE	<i>Cap analysis of gene expression</i>
CAP	Quepe/cobertura de extremidade 5´do mRNA
CD	Grupamento de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>)
CD	Células Dendríticas
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
Células NK	Células Natural Killer
CisPs	Cisteínas Proteases
CP	Cisteína protease
CP	Carga Parasitária
CR	Receptor do Complemento
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
eIF	Fator de iniciação eucariótico
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular (<i>extracellular signal regulated kinases</i>)
ESTs	Sequenciamento de sequências expressas marcadas (<i>sequencing of expressed sequence tags</i>)
FV	Fatores de virulência
GP	Glicoproteína
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GPILs	Glicosilfosfatidillipídeos
H	Histonas
HASP	Proteínas de Superfície Acilada e Hidrófila
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HSP	Proteína de Choque Térmico (<i>Heat Shock Protein</i>)
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina/citocina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP-10	gamma-induced protein 10

IPH	Interação parasita-hospedeiro
kDA	KiloDalton
KMP-11	Proteína de membrana de cinetoplastídeos de 11 kDa (<i>Kinetoplastid membrane protein-11</i>)
LACK	Proteína Quinase C Ativada de <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania Homologue of Receptors for Activated C Kinase</i>).
LC	Leishmaniose cutânea
Lcr	<i>T-cell antigens from an amastigote of L. chagasi</i>
Ldp23	<i>hydrophilic protein rich in lysine residues present on the surface of L. donovani and L. major</i>
LeIF	Fator de iniciação da tradução em <i>Leishmania</i>
LmSTI	<i>Leishmania major</i> stress induzível (<i>L. major stress-inducible 1</i>)
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
LVG	Leishmaniose visceral grave
LVNG	Leishmaniose visceral não grave
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MIG	Monoquina induzida por IFN- γ
MIP-1 α	Proteína inflamatória do macrófago (<i>macrophage inflammatory protein 1α</i>)
MPSS	Sequenciamento massivamente paralelo de sinais (<i>massively parallel signature sequencing</i>)
MPT	Modificação pós tradução
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MSP	Protease majoritária de Superfície (<i>Major Surface Protease</i>)
N	Nitrogênio
NF κ β	Fator nuclear kappa beta
NGS	Sequenciamento de nova geração (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NO	Óxido nítrico
Células NK	Células Natural Killer
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PFR	Haste (Rod) paraflagelar
PGC	Agrupamentos de Genes Policistrônicos (<i>Clusters gene polycistronic</i>)

pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína quinase C
PKDL	Leishmaniose dérmica pós calazar (Post kala-azar dermal leishmaniasis)
PPG	Proteofosfoglicanos
PSA/gp46	Proteína de superfície de promastigota de peso molecular 46 kDa
RACK	Receptor análogo da quinase C
RBP	Proteína ligadora de RNA (<i>RNA binding proteins</i>)
RIE	Resposta imune exagerada
RNA-Seq	Sequenciamento do RNA
RNA-SL	Ácido ribonucleico Spliced Leader
ROS	Espécies reativas do oxigênio
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SAGE	Análise serial da expressão gênica (<i>serial analysis of gene expression</i>)
SBS	Sequenciamento por síntese (<i>Sequencing-by-Synthesis</i>)
SHERP	Proteína hidrofílica associada ao retículo endoplasmático
SL	Sequência líder
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
STI	Proteínas induzidas por estresse
Syt	Sinaptotagminas
TAGs	Marcadores/Etiquetas
TGF-β	Fator transformador de crescimento beta
Th1/Th2	Linfócitos (timo-dependentes auxiliares) T <i>helper</i> CD4+ da subclasse funcional 1/2
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
TR	Tripanotona redutase
TXN	Triparredoxina peroxidase
TRL	Receptores <i>Toll-like</i>
tRNA	Ácido ribonucléico de transferência
TSA	Antioxidante tiol específico (<i>thiol specific antioxidant</i>)
UTR	Regiões não traduzíveis

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Objetivos	18
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3. Revisão da literatura	19
3.1 A doença leishmaniose visceral: manifestações clínicas e prognósticos de gravidade	19
3.2 Aspectos imunológicos da leishmaniose visceral clássica e leishmaniose visceral grave	21
3.3 A patogênese da <i>Leishmania</i> segundo o quadro dano-resposta	24
3.4 A virulência do parasita <i>Leishmania</i>	25
3.4.1 Fatores de virulência em promastigotas e/ou amastigotas ancorados no glicosilfostatidilinositol (GPIs)	26
3.4.1.1 Lipofosfoglicano (LPG)	26
3.4.1.2 Fosfolipídios de glicosilinositol (GIPLs)	26
3.4.1.3 Proteofosfoglicanos (PPGs)	27
3.4.1.4 KMP-11	27
3.4.1.5 Antígeno de superfície de promastigota (PSA)	28
3.4.2 Enzimas associadas a fatores de virulência em promastigotas e/ou amastigotas.	28
3.4.2.1 Leishmanolisina ou gp63	28
3.4.2.2 Cisteínas-proteases (CisPs)	28
3.4.2.3 Fosfatase ácida (AcP)	29
3.4.2.4 Sistemas Tripanotiona/Tripanotiona redutase (TR/T(SH) ₂) e Triparedoxina/ Triparedoxina peroxidase (TXN/TXNPx)	30
3.4.3 Outras proteínas e antígenos como fatores de virulência em promastigotas e/ou amastigotas	30
3.4.3.1 Proteínas de choque térmico (HSP)	30
3.4.3.2 Histonas	30
3.4.3.3 Proteína A2	31
3.4.3.4 Amastina	32

3.4.3.5	Proteína de superfície acilada e hidrófila (HASP)	32
3.4.3.6	Haste/Rod paraflagelar (PFR)	33
3.4.3.7	Análogo do receptor da proteína quinase C (LACK)	33
3.4.3.8	Antígenos <i>L. major</i> stressse induzível 1 (<i>LmSTI1</i>) e Antioxidante tiol específico (TSA)	33
3.4.3.9	Fator de iniciação eucariótico (LeIF)	34
3.4.3.10	Antígenos Lcr1 e Ldp23	35
3.5	Diagnóstico e tratamento da LV. Novas perspectivas?	35
3.6	Organização genômica da <i>Leishmania</i>	36
3.7	Transcrição e processamento pós transcricional.	38
3.8	Regulação da expressão gênica.	38
3.8.1	Controle da expressão gênica via processo traducional e modificações pós-traducionais.	40
3.9	Expressão diferencial dos genes ao longo das fases do ciclo de vida	42
3.10	Sequenciamento de nova geração (NGS)	44
3.11	RNA-Seq: a tecnologia do sequenciamento do transcriptoma	44
4	Referências Bibliográficas	47
5	Artigos derivados da tese	70
5.1	Leishmaniose visceral e fatores de virulência: Uma atualização.	72
5.2	Avaliação do perfil de expressão gênica de promastigotas em cultura axênica de cepas de <i>L. infantum</i> de pacientes com doença grave e não grave	101
6	Anexos	139

APRESENTAÇÃO

Esta tese é apresentada ao Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, ponto focal Universidade Federal do Piauí, no formato de **Artigos Científicos**, organizados com introdução, revisão da literatura geral, referências e os artigos derivados da tese no formato de publicação do periódico ao qual foi submetido.

O primeiro artigo, **Leishmaniose visceral e fatores de virulência: Uma atualização**. Trata-se de uma revisão geral sobre os fatores de virulência produzidos pelas *Leishmanias* que favorecem a sua sobrevivência nos seus hospedeiros e o estabelecimento da infecção, cuja resposta do hospedeiro pode evoluir com desfechos diferentes, podendo levar à morte. Os mecanismos que governam a relação entre parasitas e hospedeiros ainda não são bem compreendidos, muito embora essa relação possa ser influenciada por fatores próprios do hospedeiro quanto do parasita. Esses fatores, em especial dos parasitas, também são discutidos como possíveis candidatos para a terapia da leishmaniose, cujas buscas por alternativas terapêuticas vêm se ampliando através de novas abordagens que favorecem a pesquisa na identificação de produtos gênicos que possam contribuir na compreensão da biologia, da patogênese e no possível desenvolvimento de vacinas.

No segundo artigo, **Avaliação do perfil de expressão gênica de promastigotas em cultura axênica de cepas de *L. infantum* de pacientes com doença grave e não grave**, originado do trabalho experimental da tese, foi discutido o resultado das análises de expressão dos genes, de *Leishmania infantum*, obtidos a partir de cepas de pacientes que apresentaram desfechos clínicos variáveis (grave e não grave). O perfil de expressão foi comparado entre os dois grupos com o objetivo de avaliar a expressão diferencial entre eles. Foram identificados vários genes expressos pelos grupos grave e não grave, porém a expressão diferencial entre os grupos foi pequena. Vários genes que foram expressos são apontados como importantes na infectividade e na virulência destes parasitas.

1. Introdução

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por flagelados da ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania* que inclui a leishmaniose visceral (LV), bem como outras formas de leishmanioses cutâneas (LC) (MASLOV; PODLIPAEV; LUKES, 2001; FRAGA et al., 2010). Na Europa, Ásia e África os agentes causadores da LV são as espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* e no continente Americano somente a *Leishmania infantum (chagasi)* (MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000; MAURICIO et al., 2007; ZEMANOVÁ et al., 2007; FRAGA et al., 2010; SILVA et al., 2012).

A leishmaniose é endêmica em 98 países ou territórios com mais de 350 milhões de pessoas em risco. Números publicados indicam uma incidência estimada de 2 milhões de novos casos por ano sendo 0,5 milhões de casos por LV e 1,5 milhões de casos por LC. Há uma estimativa de mais de 50.000 mortes por ano, causadas pela LV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A LV distribui-se praticamente em todos os continentes com 90% dos casos ocorrendo na Índia, Bangladesh, Nepal, Etiópia, Sudão e Brasil (DESJEUX, 2001, 2004; MURRAY et al., 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; MARTINS-MELO et al., 2014). No Brasil, atualmente, a região Nordeste é responsável por 47% dos casos humanos de LV (AFONSO et al., 2012; MS, 2014).

A doença rural tornou-se endêmica e epidêmica nas grandes cidades brasileiras onde a primeira grande epidemia urbana registrada no país, foi em Teresina, capital do Estado do Piauí (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990; COSTA, 2008; WERNECK, 2008) seguida por outras epidemias descritas no Estado do Rio Grande do Norte (JERONIMO et al., 1994) e no Maranhão (SILVA et al., 2008). A crescente urbanização ampliou a doença para quase todos os Estados do país com cerca de 3.500 casos anuais. De 1980 a 2008 foram notificados mais de 70 mil casos de LV no país, levando mais de 3.800 pessoas à morte (WERNECK, 2010).

A principal forma de transmissão do parasita ao homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, conhecidos genericamente por flebotomíneos (GONTIJO; MELO, 2004; LAINSON; RANGEL, 2005). No Brasil o principal vetor da LV é o *Lutzomyia longipalpis*, encontrado em ecótopos naturais e em ambientes rurais e urbanos, próximos aos animais domésticos e as habitações humanas, onde os potenciais reservatórios silvestres são raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e gambás (*Didelphis albiventris*). Os cães (*Canis familiaris*) são reservatórios domésticos e

identificados como a principal fonte para a infecção do vetor (LAINSON; RANGEL, 2005; MAIA-ELKHOURY et al., 2008). Outras formas de transmissão também já foram registradas: congênita, uso de drogas injetáveis, transfusão de sangue e transplante de órgãos (CRUZ et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2008; QUINNELL; COURTENAY, 2009; HARHAY et al., 2011; BELO et al., 2013)

As *Leishmanias* levam um ciclo de vida digenético (Figura 1), envolvendo alternância entre um hospedeiro mamífero e um inseto vetor flebotomíneo. (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994; MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013) . Existem duas formas: promastigotas extracelulares flageladas que vivem no trato digestivo dos flebotomíneos e as formas amastigotas intracelulares obrigatórias dentro dos vacúolos dos fagolisossomos de macrófagos de mamíferos (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994). Nos mamíferos as promastigotas metacíclicas (formas infectantes) são introduzidas na pele pela picada do flebotomíneo fêmea, que são tomados por macrófagos, células dendríticas ou neutrófilos e se transformam em amastigotas intracelulares em macrófagos. (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; MURRAY et al., 2005; LANG; LECOEUR; PRINA, 2009).

Durante o repasto sanguíneo ao ingerir macrófagos infectados com amastigotas os flebotomíneos se infectam e no intestino médio posterior os parasitas diferenciam-se em várias fases de desenvolvimento caracterizadas por alterações morfológicas e funcionais destinadas a assegurar a sua sobrevivência no inseto vetor (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1999; KAMHAWI, 2006; STUART et al., 2008). Em todas as fases de vida da *Leishmania*, esta encontra ambientes hostis caracterizados por condições de crescimento que diferem significativamente entre o vetor e o hospedeiro, principalmente em relação à temperatura e pH (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994; BATES, 2007, 2008).

A evolução das formas clínicas é diversa, podendo o indivíduo apresentar desde cura espontânea, formas oligossintomáticas e assintomáticas, até manifestações graves (HERWALDT, 1999) evoluindo com sangramentos, coinfeções bacterianas, hepatite, insuficiência respiratória e edema (QUEIROZ 2004; COSTA et al., 2013) e ainda podendo alcançar letalidade entre 5 a 10% mesmo com a terapia empregada (COSTA et al., 2010). Nos últimos anos, a letalidade da leishmaniose visceral no Brasil vem aumentando gradativamente (MS, 2006). Ainda não existe estratégia eficaz para o controle dos vetores, não há vacinas que possam imunizar adequadamente e o arsenal de medidas terapêuticas é fraco (CHOI; LERNER, 2001; FORGBER et al., 2006).

Em virtude do fraco arsenal de medidas terapêuticas para a LV e a busca incessante por drogas ou vacinas que possam proteger o hospedeiro, o advento da biologia molecular trouxe inovações favorecendo novas abordagens em pesquisa. As tecnologias como o sequenciamento de nova geração (NGS) tem ampliado essas abordagens, favorecendo várias aplicabilidades para as análises de sequências genômicas, transcriptômicas e proteômicas (BINNECK, 2004; COHEN-FREUE et al., 2007; BARBOSA et al., 2012). A disponibilidade das sequências completa do genoma da *Leishmania* tem proporcionado um novo raio de esperança para a busca de novas moléculas como candidatas a vacinas (KUMARI et al., 2008) e estudos transcriptômicos têm revelado a interpretação dos elementos funcionais do genoma, para a descoberta de componentes moleculares de células e tecidos, e para o entendimento dos estágios de desenvolvimento das doenças (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

A tecnologia do RNA-Seq, tem revolucionado as análises transcriptômicas e poderá proporcionar a análise do transcriptoma completo (*de novo*) e o perfil de expressão gênica, principalmente de genes que possam estar envolvidos nos processos de infectividade e virulência de cepas de *Leishmania infantum* associadas aos desfechos clínicos graves. Esta abordagem possibilitará uma triagem de genes candidatos que poderão ser ferramentas úteis para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, biomarcadores, produção de vacinas ou drogas eficazes, além de uma variedade de aplicações biotecnológicas. Os dados gerados no sequenciamento, além de possibilitar uma compreensão geral sobre os desfechos clínicos da LV poderá promover o conhecimento sobre a biologia destes organismos.

2. Objetivos

Geral

Avaliar a expressão de genes em promastigotas de *L. infantum* isoladas de pacientes com leishmaniose visceral grave e não grave.

Específicos:

1. Avaliar a expressão dos genes identificados através da técnica de RNA-Seq;
2. Validar através do uso de ferramentas de Bioinformática a análise do perfil de expressão dos genes;
3. Estabelecer correlação entre os genes expressos e os desfechos clínicos.

3. Revisão da Literatura

3.1 A doença leishmaniose visceral: manifestações clínicas e prognóstico de gravidade.

A LV engloba uma ampla variedade de manifestações que parecem ser semelhante em todo mundo. Ela resulta da multiplicação da *Leishmania* dentro dos fagócitos mononucleares e pode ainda ser encontrada dentro dos neutrófilos, ou livremente, principalmente no baço, que pode abrigar a maior carga de parasitas. A medula óssea também é muito parasitada além do fígado e linfonodos serem importantes sítios de infecção. Esporadicamente os parasitas podem ser identificados no sangue periférico (VERESS et al., 1977; CHANDRA; CHANDRA; KAUSHIK, 2013; HELLAL; KUNDU, 2013; SILVA et al., 2014;). O período de incubação é variável geralmente entre 3 a 8 meses e as manifestações podem aparecer a partir de 10 dias a 1 ano seguido da exposição (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

A maioria das pessoas infectadas com espécies visceralizantes de *Leishmania* experimentam a infecção assintomática e apenas uma pequena proporção das infecções podem levar a doença grave (KEDZIERSKI; EVANS, 2014). Portanto, a expressão de uma infecção por *Leishmania* recentemente adquirida varia de nenhuma (subclínica), para oligossintomática, ou a forma plenamente estabelecida (calazar) (MURRAY et al., 2005), que clinicamente expressa; febre, fraqueza, sudorese noturna, palidez, anorexia e perda de peso como sintomas mais comuns e progride ao longo de semanas a meses (OSMAN; KAGER; OSKAM, 2000; WERNECK et al., 2003; COLLIN et al., 2004; BRAGA; TOLEDO; RABELLO, 2013).

As crianças podem desenvolver diarreia, atraso no crescimento e distensão abdominal, ocasionado principalmente pela disseminação dos parasitas que induzem ao acúmulo de células fagocíticas mononucleares no âmbito dos órgãos invadidos e leva a uma hiperplasia secundária das células reticulo-endoteliais que se manifestam clinicamente como esplenomegalia e hepatomegalia (Figura 2), todos os sinais clássicos da LV (GRECH et al., 2000).

Além disso, as complicações inerentes ao processo infeccioso decorrente do estabelecimento da leishmaniose visceral clássica podem levar à progressão para a leishmaniose visceral grave (LVG) e à morte. Nas duas últimas décadas, a LV reapareceu no mundo de forma alarmante e resulta em morte se não for tratada (PISCOPO; MALLIA AZZOPARDI, 2007; MS, 2011). E vários fatores prognósticos têm sido associados com o

risco de morte por LV (WERNECK et al., 2003; COLLIN et al., 2004; COSTA et al., 2010; DE QUEIROZ SAMPAIO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; COSTA et al., 2013; COURA-VITAL et al., 2014; DRUZIAN et al., 2015). Em um estudo retrospectivo de coorte de crianças e adolescentes com até 14 anos de idade admitidos em um hospital para tratamento por LV, foram identificados fatores de risco associados com morte como: hemorragia das mucosas, icterícia, dispnéia, infecções bacterianas, redução do número de neutrófilos e plaquetas (DE QUEIROZ et al., 2010).

Um outro estudo de caso-controle, também obteve como resultado associado a morte por LV, as infecções bacterianas, principalmente relacionadas a pneumonia e septicemia (COSTA et al., 2010). Além disso, o sangramento foi outro resultado deste estudo, que além da associação com a evolução grave da doença foi relacionado com a carga parasitária da medula óssea e a anemia grave (COSTA et al., 2010). Uma forte correlação entre os pacientes com LV e a carga parasitária da medula óssea também foi demonstrado por um estudo, cujos pacientes que morreram e aqueles que tiveram um curso clínico dramático com epistaxe, edema e icterícia foi verificado que a carga parasitária era maior (SILVA et al., 2014).

Outro fator de risco associado com a morte por LV é a própria terapia empregada. Até o momento, os antimoniais pentavalentes, o estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina tem sido o tratamento de primeira linha para LV em muitas áreas há mais de 70 anos (CHAPPUIS et al., 2007). Os efeitos adversos com os antimoniais são freqüentes e a morte por causa de pancreatite aguda ou disritmia cardíaca podem ocorrer (MUELLER et al., 2009). Em um estudo realizado, foi relatado uma taxa de mortalidade em torno de 18,5% com o uso de antimoniais em pacientes com LV (LYONS; VEEKEN; LONG, 2003).

No Brasil, a resposta aos antimoniais pentavalentes é satisfatória, mas a taxa de mortalidade é também elevada em torno de 9% (JERONIMO et al., 1994; WERNECK et al., 2003). Também foi demonstrado, que crianças com menos de 1 ano de idade e pacientes com comorbidades ou infecções bacterianas apresentavam maior risco de resposta insatisfatória ao tratamento com antimoniais (SANTOS et al., 2002).

De modo geral, tanto o parasita quanto a resposta imune do hospedeiro são determinantes no desenvolvimento da doença e podem influenciar na taxa de falha do tratamento (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Desta forma, também foi demonstrado, que mesmo com o tratamento recomendado, alguns pacientes evoluíam com sangramento intenso, coagulação intravascular disseminada, neutropenia, trombocitopenia, co-infecções bacterianas, dispnéia, edema, icterícia e/ou vômitos que levavam à morte (COSTA et al., 2013).

Sendo assim, o reconhecimento precoce dos pacientes que poderão evoluir com gravidade é de fundamental importância para reduzir a letalidade por meio da instituição de medidas profiláticas e terapêuticas oportunas (MS, 2011).

Assim, a identificação dos fatores prognósticos poderá auxiliar na redução das taxas de mortalidade através do desenvolvimento de novas intervenções médicas, auxiliando no monitoramento da progressão da doença, e facilitando o aconselhamento de pacientes sobre o seu futuro estado de saúde (MOONS et al., 2009; RILEY et al., 2013). No caso da LV, indicadores prognósticos de gravidade da doença também podem ser usado para determinar se o tratamento deve ser realizado em unidades básicas de saúde ou nos centros de cuidados especializados, e seria de valor considerável na prescrição de intervenções específicas para os pacientes que correm maior risco de êxito letal (WERNECK, 2003; DE QUEIROZ SAMPAIO et al., 2010; MS, 2011; BELO et al., 2014).

3.2 Aspectos imunológicos da leishmaniose visceral clássica e leishmaniose visceral grave

A imunidade à infecção por *Leishmania* é mediada por células e resulta na morte de organismos intracelulares por macrófagos ativados e respostas citotóxicas (BACELLAR et al., 2000). Vários fatores influenciam a resistência ou susceptibilidade à LV, incluindo o parasita, a genética do hospedeiro e fatores do ambiente (KUMAR; NYLÉN, 2012). Após a entrada de promastigotas metacíclicas na derme do paciente o sistema imune inato da pele detecta as promastigotas invasoras e recruta células inflamatórias para o local da invasão além de propiciar a indução da imunidade adaptativa envolvendo neste processo receptores de reconhecimento de padrões e receptores complementares presentes em diferentes células, incluindo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK (Natural Killer) (KHADEM; UZONNA, 2014). O reconhecimento do parasita por receptores tipo “Toll” (TRLs) conduz à ativação de vias de sinalização intracelular que são necessárias para a iniciação de respostas inflamatórias e de controle da proliferação dos parasitas pela resposta imune inata (FARIA; REIS; LIMA, 2012).

Os neutrófilos desempenham um papel importante, podem modular o desenvolvimento da resposta imune anti-*Leishmania* pela sua capacidade em secretar citocinas, quimiocinas e conteúdo granular, além da sua interação direta com outras células residentes e inflamatórias no local da infecção (TACCHINI-COTTIER et al., 2000; RIBEIRO-GOMES et al., 2007; CHARMOY et al., 2010; RIBEIRO-GOMES; SACKS,

2012). Na verdade, os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao local da infecção dentro de poucos minutos após a picada pelo flebotomíneo (PETERS et al., 2009). Sendo importante notar, que no interior dos neutrófilos os parasitas podem sobreviver, mas nenhuma multiplicação dos parasitas foi observada (LAUFS et al., 2002). Portanto, essas células podem servir apenas como hospedeiras temporárias para os parasitas dentro das primeiras horas/dias após a infecção (AGA et al., 2002; VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

Em geral, pouco se sabe sobre o papel dos neutrófilos na leishmaniose humana. Porém em estudos baseados em neutrófilos humanos (e macrófagos), foi verificado que nas infecções com *L. major*, os neutrófilos funcionavam como células hospedeiras que entravam em apoptose, cuja estratégia, chamada de "cavalo de Tróia" facilitava a transferência do parasita para os macrófagos do hospedeiro (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Outra estratégia, denominada de “coelho de Tróia”, foi verificado que os parasitas, *Leishmania major*, escapam dos neutrófilos antes de infectarem macrófagos (PETERS et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que a chegada de macrófagos para o local da infecção podem induzir apoptose de neutrófilos, um efeito reforçado pela presença dos parasitas (ALLENBACH et al., 2008). Nesta estratégia, os neutrófilos apoptóticos também silenciam os macrófagos do hospedeiro, permitindo uma infecção produtiva da *Leishmania* (RITTER; FRISCHKNECHT; VAN ZANDBERGEN, 2009).

Os neutrófilos também desempenham um papel importante no controle do crescimento inicial do parasita no baço e na medula óssea, mas não no fígado (ROUSSEAU et al., 2001), fato que foi confirmado por um estudo realizado (MCFARLANE et al., 2008) que verificaram que a depleção de neutrófilos no início da infecção por *L. donovani* levou a um aumento da carga de parasitas tanto no baço quanto na medula óssea, mas não foi observado no fígado. De modo geral, parece que a ausência de neutrófilos proporciona um meio perfeito para o desenvolvimento de respostas Th2 não protetora (BACELLAR et al., 2000).

Outras células que fagocitam *Leishmania* e contribuem para os processos de decisão inicial que regulam a resistência e/ou suscetibilidade à infecção são as células dendríticas e os macrófagos. As células dendríticas infectadas produzem IL-12, que é crítico para o desenvolvimento de células CD4⁺ Th1 na produção de IFN- γ , já a ausência de IL-12 leva a expansão progressiva de células Th2 (KHADEM; UZONNA, 2014). No entanto, ao contrário das células dendríticas, os macrófagos infectados por *Leishmania* são incapazes de produzir IL-12 e, portanto, acredita-se que não desempenham um papel significativo na iniciação da imunidade adaptativa protetora (GORAK; ENGWERDA; KAYE, 1998; KHADEM;

UZONNA, 2014)]. Porém, uma vez que os macrófagos são as principais células efetoras na leishmaniose, estas podem ser instruídas para matar ou para promover o crescimento de parasitas intracelulares como a *Leishmania*, e isso, depende do equilíbrio de duas enzimas induzíveis, a óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e arginase. Estas duas enzimas utilizam um substrato comum, L-arginina, e são reguladas de forma competitiva por citocinas tipo1 (IFN- γ , TNF- α , TNF- β) e tipo 2 (IL-4, IL-10, IL 13) (MODOLELL et al., 1995; GANTT et al., 2001).

Desse modo, o destino do parasita intracelular vai depender da resposta montada pelo tipo de sinal que o macrófago recebe: se o tipo 1 que induz a ativação clássica do macrófago e expressão da óxido nítrico sintase induzível (NOS2) que oxida L-arginina em óxido nítrico (NO), um metabolito responsável pelo morte do parasita (GANTT et al., 2001; DESCHACHT et al., 2012) ou do tipo 2 que resulta na ativação alternativa dos macrófagos e a indução da arginase (LOKE et al., 2002). A arginase inicia uma das vias clássicas de degradação da arginina produzindo poliaminas que são necessárias para o crescimento do parasita além de regular a síntese de NO (WU; MORRIS, 1998). Em um trabalho desenvolvido *in vivo*, foi demonstrado que a manutenção da atividade da arginase promove o crescimento do parasita e o desenvolvimento descontrolado da patologia (KROPF et al., 2005).

Além das TRLs, os receptores do sistema complemento contribuem para a detecção da infecção por *Leishmania* e a promoção da iniciação de respostas inflamatórias. Após a infecção com promastigotas na pele, ambas as vias, clássica e alternativa, do sistema complemento são ativadas, promovendo a lise dos parasitas mediada pelo complexo de ataque à membrana, embora, algumas espécies do parasita *Leishmania* evoluíram para explorar esta via para melhorar a sua infecciosidade e sobrevivência no hospedeiro (LAURENTI et al., 2004; MAURER; DONDJI; VON STEBUT, 2009).

Em um estudo desenvolvido com *L. infantum (chagasi)*, mostrou que as promastigotas metacíclicas entram nos macrófagos através do receptor CR3, que reconhece a proteína do complemento inativada (C3bi), e não estimula a liberação de intermediários reativos do oxigênio que atacam o parasita, ou seja, ocorre transitoriamente subversão da atividade dos macrófagos (UENO et al., 2009).

De modo geral, uma forte resposta de produção de citocinas induzidas durante a LV, principalmente a produção de IFN- γ , parece crucial para o controle dos parasitas e para o desenvolvimento de resistência à infecção (KEDZIERSKI; EVANS, 2014). No entanto, várias citocinas e quimiocinas são produzidas em resposta à infecção por LV com níveis elevados de IFN- γ , TNF, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-33, IP-10 e MIG observados no soro

de pacientes com LV (KURKJIAN et al., 2006; COSTA et al., 2012). Assim, a infecção ativa não é devido a ausência de uma resposta pro-inflamatória, mas está associada com a presença de ambas as citocinas Th1 e Th2. Desse modo, o paradigma Th1 e Th2, que retrata a LC, não tem um papel tão claro na determinação dos perfis de resistência/susceptibilidade na infecção em humanos ou em modelos experimentais com LV (MIRALLES et al., 1994).

Um novo quadro biológico envolvendo citocinas inflamatórias e gravidade da doença em pacientes com LV foi mostrado (COSTA et al., 2013), onde as concentrações mais elevadas de IL-6, IL-8, IFN- γ precederam a morte em pacientes com LV, mas não de outras citocinas inflamatórias. Além disso, IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , e TNF- α também foram correlacionadas com uma matriz de dados clínicos e laboratoriais tipicamente encontrados em pacientes com LV grave. Neste trabalho, também foi verificado que a IL-6 e IFN- γ estavam fortemente associados como marcadores da coagulação intravascular disseminada e a IL-6 ainda parece desempenhar um papel central no desencadeamento de sintomas e controle de outras citocinas (COSTA et al., 2013). Este quadro biológico levou (COSTA et al., 2010) a acreditar na hipótese de que estas citocinas medeiam a patogênese da LV grave, sugerindo resultados semelhantes aos da sepse e da malária, cujo mecanismo é a resposta inflamatória sistêmica com falência múltipla dos órgãos.

3.3 A patogênese da *Leishmania* segundo o quadro dano-resposta

As interações parasita-hospedeiro (IPH) deflagram a patogênese da doença, e tanto o parasita quanto hospedeiro contribuem para o desenvolvimento da mesma, que pode gerar danos ao hospedeiro ou não, dependendo da sua resposta imunológica (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999). Neste contexto, é possível analisar a patogênese da leishmaniose sob o ponto de vista do quadro dano-resposta no qual se avalia os danos no hospedeiro como uma função da resposta imune no próprio hospedeiro e cujos danos variam de acordo com a magnitude da resposta imune (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999, 2003, 2009).

A resposta imune fraca é insuficiente para trazer benefícios ao hospedeiro e os danos são gerados principalmente pelo patógeno. Já, respostas imunes fortes são excessivamente inapropriadas e também geram danos ao hospedeiro (CASADEVALL; PIROFSKI, 2003; PIROFSKI; CASADEVALL, 2015). Uma resposta que evita ou minimiza danos no hospedeiro é considerada adequada (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999). Badaró et. al., demonstraram que a proporção da LV subclínica em relação à sintomática é estimada em até 18:1 (BADARO et al., 1986), Assim, muitas pessoas infectadas com espécies causadoras de LV desenvolvem uma resposta imune eficaz e a doença clínica não se manifesta (MCCALL;

ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013) No entanto, uma resposta imune fraca, promovida por uma imunossupressão induzida pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias (Th-1/IL-12) e contrabalanceada pelas regulatórias (Th-2/IL-10), favorece o estabelecimento da infecção, provavelmente através dos mecanismos de defesa do parasita, fatores de virulência (FV), bem como a visceralização e o crescimento da *Leishmania* (MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013). O hospedeiro torna-se sintomático e manifesta neste quadro (Figura 3), o desenvolvimento de febre, hepatoesplenomegalia, perda de peso e anemia, ou seja, os sinais clássicos da LV (NYLÉN; SACKS, 2007; VERMA et al., 2010; COSTA et al., 2013).

Por outro lado, uma vez que estes parasitas não produzem toxinas e não destroem as células do parênquima (COSTA et al., 2010), um quadro de resposta imune celular excessiva, mediado pela liberação de várias citocinas como, interleucinas 6 e 8 (IL-6, IL-8), interferon- γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral (TNF) foi associado com a inflamação sistêmica prejudicial, permitindo tanto a proliferação da *Leishmania*, quanto o desenvolvimento dos sintomas, gerados pelos danos causados pela resposta imune exagerada (RIE), tais como, as manifestações hemorrágicas, icterícia, sepse, edema e insuficiência renal (glomerulonefrites) caracterizando a leishmaniose visceral grave com progressão letal (COSTA et al., 2010, COSTA et al., 2013; SILVA et al., 2014). Recentemente, foi demonstrado por Silva et al., 2014 que os pacientes que tinham morrido apresentaram uma carga parasitária muito maior do que aqueles que foram curados, sugerindo que a carga parasitária, de fato, aumenta a inflamação sistêmica. Além disso, a desnutrição, aparentemente, prejudica a resposta efetiva do hospedeiro uma vez que o baixo peso foi associado à carga parasitária (SILVA et al., 2014).

3.4 A virulência do parasita *Leishmania*

Além da resposta imune montada que define a patogênese em termos de danos ao hospedeiro, outro aspecto importante e que também afeta a IPH é a virulência, uma propriedade do patógeno, mas modulada pela susceptibilidade e resistência do hospedeiro (CASADEVALL; PIROFSKI, 2001, 1999). Vários componentes microbianos são determinantes para o desenvolvimento da virulência por facilitar a entrada e a evasão das defesas do hospedeiro bem como favorecer a replicação, neutralização das respostas imunes e a capacidade de adquirir nutrientes e sentir as mudanças do meio ambiente (CASADEVALL; PIROFSKI, 2009, 1999).

Na *Leishmania*, durante a diferenciação de promastigota para amastigota, o parasita sofre alternância de hospedeiro e é sujeito a mudanças rápidas em função do novo ambiente, (MCCONVILLE; HANDMAN, 2007). Assim, as alterações morfológicas e fisiológicas que estes parasitas sofrem são o resultado da regulação diferencial de uma variedade de genes e proteínas que são expressos e dão a estes organismos a capacidade de resistir e sobreviver a essas novas condições (ROCHETTE et al., 2009). Nesta IPH, os múltiplos FV produzidos (Tabela 1), podem intensificar o grau de dano ao hospedeiro em função do grau da resposta imune induzida (CHANG, 1990), embora, nenhum FV que possa desencadear a doença grave da LV, foi identificado.

3.4.1 Fatores de virulência em promastigotas e/ou amastigotas ancorados no glicosilfostatidilinositol (GPIs)

3.4.1.1 Lipofosfoglicano (LPG)

É a principal macromolécula do glicocálix da superfície de promastigotas (MOODY; MCCONVILLE; BACIC, 1993). Diferenças na composição dos açúcares destas moléculas, tem sido relacionadas a variabilidade intra e inter-espécies com implicações na antigenicidade destes parasitas (COELHO-FINAMORE et al., 2011; IBRAIM et al., 2013). As *Leishmanias*, para sobreviverem intracelularmente, utilizam estratégias que desativam funcionalmente os macrófagos das células hospedeiras, geralmente, manipulando vias de transduções de sinais (REINER, 1994).

Recentemente, em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) humanas infectadas com *L. mexicana*, foi demonstrado que o LPG pode induzir a produção de citocinas pelos receptores TLR2 e TLR4 (Toll-like) dos macrófagos, mediados pelas vias, quinase extracelular regulada por sinal (ERK) e proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK) (ROJAS-BERNABÉ et al., 2014). Na *L. major*, em estudos *in vitro* com PBMCs humanas, a sinalização ativada pelo LPG, resultou em produção elevada de citocinas e espécies reativas do oxigênio (ROS) (KAVOOSI; ARDESTANI; KARIMINIA, 2009).

3.4.1.2 Fosfolipídios de glicosilinositol (GIPLs)

A superfície de promastigotas e amastigotas de *Leishmania* é também revestida com uma classe de pequenos fosfolipídios de glicosilinositol (GIPLs) (DESCOTEAUX; TURCO, 1999). Em *L. donovani*, bem como *L. infantum* e *L. brasiliensis* foi verificado através de estudos *in vitro* em macrófagos murinos, que os GIPLs ajudam na sobrevivência dentro do

macrófago por inibir a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na produção de NO, que é tóxico para esses parasitas, além da via de sinalização dependente da Proteína quinase C (PKC) (CHAWLA; VISHWAKARMA, 2003; ASSIS et al., 2012;).

3.4.1.3 Proteofosfoglicanos (PPGs)

São polipeptídeos altamente glicosilados com potenciais para virulência e que podem ser encontrados em várias formas; a filamentosa (fPPGs), a secretada (sPPGs) e à forma ligada a componentes de membrana (mPPGs). Estas diferentes formas dos PPGs desempenham papéis importantes no estabelecimento da infecção pela *Leishmania* (ILGS et al., 1994; ILG et al., 1996). Foi demonstrado, que o fPPG secretado pelo parasita é inoculado junto com a saliva do inseto vetor (*L. longipalpis*) na pele do hospedeiro facilitando a infecção e a visceralização do parasita em modelos murinos *in vivo* (STIERHOF et al., 1999; ROGERS et al., 2010). Já os sPPGs, parecem ser um potente indutor de ROS e IL-10, e em menor grau de IFN- γ e IL-12, nas PBMCs humanas em trabalhos *in vitro* (KAVOOSI et al., 2008).

3.4.1.4 KMP-11

É um complexo protéico, assim chamado, devido à presença de uma proteína de 11 kDa (kiloDalton) na membrana de todos os protozoários cinetoplastídeos (STEBECK et al., 1995). Em macrófagos murinos infectados (*in vitro*) com *L. amazonensis*, o aumento da CP é o resultado da estimulação da produção de IL-10, e da atividade da arginase que inibe a síntese de NO, induzidos pela KMP-11, favorecendo a replicação do parasita (LACERDA et al., 2012).

A antigenicidade destas proteínas também foram demonstradas em modelos caninos infectados com *L. infantum* (*in vivo*), e em PBMCs humanas infectadas com *L. donovani* (*in vitro*) em que promoveu um aumento do nível de expressão dos mRNAs de IFN- γ , induzindo respostas imunes Th1 (CARRILLO et al., 2008). Além disso, a ativação da via do fator de transcrição nuclear (NF κ - β), através das células dendríticas (CD), induzindo a produção de IL-10 e do fator transformador de crescimento beta (TGF- β) em macrófagos, podem alterar o resultado da doença (CHAUDHARY et al., 2014).

3.4.1.5 Antígeno de superfície de promastigota (PSA)

Também conhecido como (gp46), representa uma glicoproteína de superfície abundante que está presente em duas formas: solúvel e ancorada à membrana (BEETHAM; DONELSON; DAHLIN, 2003). Na *L.infantum*, este antígeno é capaz de induzir *in vitro*, a resistência a lise mediada pelo sistema complemento humano (LINCOLN et al., 2004). Também foi sugerido, que esta proteína, favoreceu a proliferação celular (*in vitro*) da *L. donovani*, da superfície da pele dos pacientes com PKDL (Leishmaniose dérmica pós calazar) (SALOTRA et al., 2006).

3.4.2 Enzimas associadas a fatores de virulência em promastigotas e/ou amastigotas.

3.4.2.1 Leishmanolisina ou gp63

É uma metaloproteinase de 63 kDa, presente na superfície das *Leishmanias* (RAMAMOORTHY et al., 1992), que atua sobre uma ampla gama de substratos das células hospedeiras alterando a maquinaria de vias de sinalização celular como, a inibição da p38 MAPK (HALLÉ et al., 2009). Recentemente foi identificado na *Leishmania*, um sistema de secreção baseado nos exossomos (SILVERMAN et al., 2010) onde a gp63 secretada por este sistema na *L. major*, é crucial para a diminuição da resposta inflamatória inata *in vitro*, durante o início da infecção pelo parasita em macrófagos murinos (HASSANI et al., 2014).

Também foram identificados, um grande grupo de proteínas de membranas, denominadas de sinaptotagminas (Syt) (VINET; FUKUDA; DESCOTEAUX, 2008), em macrófagos murinos, como a Syt XI, que promove a regulação da secreção de citocinas (TNF e IL-6), a captação de partículas na fagocitose e a atividade microbicida dos macrófagos (ARANGO DUQUE; FUKUDA; DESCOTEAUX, 2013). A gp63 de promastigotas de *Leishmania major* e *L. donovani* degradam a Syt XI dos vacúolos parasitóforos de macrófagos murinos, *in vitro*, favorecendo um aumento da secreção de TNF e IL-6 além do recrutamento de fagócitos para o local da infecção, contribuindo para o estabelecimento da doença (ARANGO DUQUE et al., 2014).

3.4.2.2 Cisteínas-proteases (CisPs)

São enzimas que exibem papéis críticos na patogênese de várias infecções por parasitas protozoários. A maioria das CisPs de *Leishmanias*, foram denominadas de: CPA e

CPB (Catepsinas tipo L) e CPC (Catepsinas tipo B) (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004). Recentemente, foi verificada uma grande diversidade de genes de proteases entre as espécies de *Leishmanias*, um aspecto que pode estar relacionado com suas adaptações à cada microambiente habitado por estes parasitas, (SILVA-ALMEIDA et al., 2014). Variações no padrão de expressão de genes das CisPs em hospedeiros murinos com distintos níveis de susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis*, foram observados e os genes CPBs expressaram mais do que os CPCs, independente da linhagem do hospedeiro (PEREIRA; BRITTO; ALVES, 2012).

Em *L. infantum*, foi demonstrado *in vitro*, que a CPA está relacionada com a habilidade em infectar as células do hospedeiro mamífero (DENISE et al., 2006), e a CPC, além de auxiliar na IPH, também colabora com a sobrevivência dentro dos macrófagos humanos, através da ativação do TGF- β latente (SOMANNA; MUNDODI; GEDAMU, 2002). Mais recentemente, investigaram o papel das CPCs, em CD e macrófagos murinos infectados *in vitro* por *L. major*, avaliando o controle dos mediadores da resposta Th1 durante a infecção e a proliferação dos parasitas. Os dados mostram que a CPC induziu uma maior expressão de citocinas IL-12 liberadas pela resposta Th1, sugerindo que esta protease tenha um papel regulador sobre esta resposta em função da sua sub-regulação (GONZALEZ-LEAL et al., 2014).

3.4.2.3 Fosfatase ácida (AcP)

As proteínas AcPs que apresentaram localização extracelular do seu domínio catalítico, pertencem a uma nova família de ecto-fosfatases e foram identificadas na superfície celular de promastigotas de *L. major* (AGUIRRE-GARCÍA et al., 2006) e *L. amazonensis* (ALMEIDA-AMARAL et al., 2006). Recentemente, uma AcP de membrana da *L. donovani* (*LdMAcP*), foi caracterizada como polimórfica e divergente na especificidade dentro do complexo da *L. donovani*, sugerindo diferenças na localização e/ou na atividade enzimática. Além disso, é possível que esta proteína, manipule um sistema de reconhecimento de sinal em macrófagos murinos, a fim de obter acesso para sobreviver no meio intracelular (PAPADAKI et al., 2015).

3.4.2.4 Sistemas Tripanotiona/Tripanotiona redutase (TR/T(SH)₂) e Triparedoxina /Triparedoxina peroxidase (TXN/TXNP_x)

O sistema TR/T(SH)₂, é um complexo multienzimático central nos sistemas de defesa redox dos *Tripanossomatídeos* (DUMAS et al., 1997). Em *L. infantum*, foram identificados dois genes que codificavam, uma TXN localizada no citosol (*LiTXN1*) e outra na mitocôndria (*LiTXN2*), esta última, parece participar de uma via para a desintoxicação do hidroperóxido em mitocôndrias, semelhante ao da proteína citosólica (CASTRO et al., 2004).

Em *L. donovani* transfectada com uma cTXNP_x mais resistente ao H₂O₂ e NO, foi demonstrado *in vitro* um aumento de expressão da proteína e da virulência, gerando elevada CP nos macrófagos murinos (IYER et al., 2008). A importância desta enzima, também foi verificada, ao longo do ciclo de vida da *L. infantum* (ROMAO et al., 2009), bem como o seu papel, nas funções efectoras das células B, conduzindo à secreção de IL-10 e a produção de anticorpos específicos potencializando a progressão da doença (MENEZES CABRAL et al., 2008).

3.4.3 Outras proteínas e antígenos como fatores de virulência em promastigotas e/ou amastigotas

3.4.3.1 Proteínas de choque térmico (HSP)

São proteínas que exibem funções de chaperonas auxiliando nos dobramentos protéicos, montagens de proteínas complexas e nas translocações de proteínas através dos compartimentos celulares (BLACHERE et al., 1997; RAFATI et al., 2007). Na *L. donovani* a HSP70 foi caracterizada como um antígeno dominante, alvo da resposta imune humoral nas infecções (MACFARLANE et al., 1990). Em *L. infantum*, também foi demonstrado que as proteínas HSP70 e HSP83 se comportam como potentes mitógenos *in vitro* para as células B dos esplenócitos murinos (RICO et al., 2002). Recentemente, foi avaliado *in vitro* a eficácia protetora destas proteínas em murinos infectados com *L. donovani*, mostrando uma forte resposta protetora contra a LV, verificada pela CP reduzida e aumento dos níveis de IgG2a, IFN- γ e IL-2 (KAUR; KAUR; KAUR, 2011).

3.4.3.2 Histonas

São proteínas conservadas que se associam com o DNA para formar o nucleossoma em eucariotos. Na *L. infantum*, as histonas nucleares induziram uma resposta humoral *in vitro*

com o soro de cães com LV (LVC) (SOTO et al., 1995). Foi demonstrado, que a histona H2B da *L. major*, apresenta tanto a capacidade de induzir a proliferação de altos níveis de PBMCs humanas, *in vitro*, quanto IFN- γ em indivíduos com LC, além de promover uma resposta Th1 com menor nível de IL-10 (MEDDEB-GARNAOUI et al., 2010). Na *L. donovani* proveniente de pacientes com LV resistente aos antimônios, a avaliação da expressão dos genes, identificaram elevada expressão que codificavam várias histonas (H1, H2A, H4) e MAPK1 (SINGH et al., 2010).

3.4.3.3 Proteína A2

Foi identificada pela primeira vez em amastigotas de *L. donovani* (CHAREST; MATLASHEWSKI, 1994). E a sua expressão foi demonstrada em *L. major*, caracterizando o seu papel na sobrevivência e na visceralização do parasita (ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001). MCCALL et al., (2010) indentificaram uma chaperona ligada ao retículo endoplasmático (BiP) que colocaliza-se e liga-se com a proteína A2, seguinte ao estresse pelo choque térmico. Este mecanismo parece ser importante na proteção da *L. donovani* ao stress associado pela infecção em órgãos viscerais, incluindo a febre (MCCALL; MATLASHEWSKI, 2010) e estresse oxidativo (MCCALL; MATLASHEWSKI, 2012; SARKAR et al., 2012).

Diferenças no nível de expressão do mRNA da proteína A2 em pacientes com LV e PKDL por *L. donovani* e pacientes com LC por *L. tropica* mostraram níveis mais elevados de expressão na LV e mais baixo na PKDL e LC (SHARMA et al., 2010). Apesar da LV e PKDL serem provenientes do mesma espécie, tem sido recentemente sugerido que polimorfismos (SNPs) e/ou variações no número de cópias de genes da mesma espécie (*L. donovani*), pode estar relacionado com esses fenômenos, responsáveis pela diferença no tropismo e na patologia alterada (ZHANG et al., 2014). Esses fenômenos, também já foram observados, onde a amplificação do cromossomo pode alterar a expressão dos genes em resposta às condições ambientais do hospedeiro, fornecendo uma base genética para o tropismo da doença (ROGERS, 2012).

Recentemente, foi demonstrado através de análise proteômica, que cepas de *L. donovani* que causavam síndromes clínicas diferentes, não apresentavam grandes mudanças nos perfis proteômicos, mas diferiram em vias de síntese, proteção e sinalização em relação às vias de transporte e tráfico, sugerindo que a *L. donovani* é adaptável e pode remodelar seu proteoma para sobreviver em diferentes ambientes no seu hospedeiro (MCCALL et al., 2015). Todas estas observações mostram que a proteína A2 desempenha um papel importante na

sobrevivência destes parasitas, e a avaliação da imunização com proteína recombinante A2 mostrou significativa proteção contra a infecção, além de proteção parcial contra espécies de *Leishmania*, induzindo uma resposta imune Th1, o que a capacita para ser alvo potencial de vacina (GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001; ZANIN et al., 2007).

3.4.3.4 Amastina

É uma proteína de superfície abundante que foi identificada em amastigota de *Leishmania*, e compartilha homologia com as amastinas do *T. cruzi* (WU et al., 2000). A análise de expressão em *L. major* e *L. infantum* demonstraram que algumas amastinas são estágio-específica do seu ciclo de vida, e que os perfis de expressão dos vários ortólogos são diferentes entre estas duas espécies (ROCHETTE et al., 2005).

Em um recente trabalho com *L. braziliensis*, foi demonstrado que as amastinas α , β , γ e δ são localizadas na superfície do parasita e que a não expressão da δ -amastina, resulta em diminuição da sobrevivência e proliferação dos parasitas intracelulares tanto após a infecção *in vitro* de macrófagos murinos quanto a infecção *in vivo* dos camundongos. Além disso, alterações significativas entre as interações de membranas dos macrófagos e das amastigotas intracelulares, sugerem que as amastinas são FV essenciais para a replicação do parasita no interior da célula hospedeira do mamífero (DE PAIVA et al., 2015).

3.4.3.5 Proteína de superfície acilada e hidrófila (HASP)

Também classificada como HASPA e HASPB em *Leishmania*, são estágio reguladas e expressas na membrana plasmática do parasita apenas nas fases infecciosas (metacíclica e amastigota) (ALCE et al., 1999). Estas proteínas apresentam domínios centrais repetitivos altamente variáveis nas suas sequências de aminoácidos, dentro e entre espécies, o que as capacitam na antigenicidade ao cão e ao homem, consistente com o papel no reconhecimento imune do hospedeiro (MORENO et al., 2007; DEPLEDGE et al., 2010). Recentemente, identificaram polimorfismos na região repetida k26 da HASPB, mostrando variabilidade entre os isolados de *L. donovani* de diferentes origens (ZACKAY et al., 2013).

Outra proteína metacíclica é a SHERP (proteína hidrofílica associada ao retículo endoplasmático), cujo gene é encontrado dentro da família de genes *LmcDNA16* da *L. major* (SÁDLOVÁ et al., 2010). Além disso, juntamente com a HASPB, desempenham um papel vital no processo de diferenciação e/ou no parasita metacíclico da *L. major* (SÁDLOVÁ et al., 2010; MOORE et al., 2011; MACLEAN et al., 2012).

3.4.3.6 Haste/Rod paraflagelar (PFR)

Estas proteínas são um dos vários atributos únicos que caracterizam a biologia dos protozoários cinetoplastídeos. Os primeiros estudos identificaram duas proteínas abundantes, a PFR-1 e PFR-2 (PORTMAN; GULL, 2010). O papel funcional da PFR foi demonstrado em mutantes nocauteados de *L. mexicana* onde causou uma grande redução na velocidade da motilidade destes parasitas (SANTRICH et al., 1997). Estas proteínas foram diferencialmente expressadas em promastigotas pró-cíclicas e metacíclicas de *L. major*, correspondente com as etapas infecciosas onde se observa maior necessidade de motilidade (MOJTAHEDI; CLOS; KAMALI-SARVESTANI, 2008).

3.4.3.7 Análogo do receptor da proteína quinase C (LACK)

Na *Leishmania*, o antígeno LACK é um análogo do receptor da proteína quinase C ativada em mamíferos (RACK), e muito conservado entre espécies de *Leishmania* (GONZALEZ-ASEGUINOLAZA et al., 2001). A sua expressão ocorre em ambas as formas do parasita (HAMMOUDEH et al., 2014) e as sequências dos genes LACK em espécies que causam a LV, são altamente conservados e apresentam pouca variabilidade e maior antigenicidade (SINHA; KUMAR; SUNDARAM, 2013). Esta antigenicidade foi demonstrada a partir de diferentes epítomos da proteína LACK provenientes da *L. major*, que estimularam o aumento dos níveis de mRNA de IL-4 pelas células T CD4+ (LAUNOIS et al., 2007).

Em *L. infantum*, a LACK foi localizada próxima ao cinetoplasto e interage com sequências de proteínas que estão envolvidas em uma variedade de funções, desde replicação do DNA, síntese do RNA, processamento de sinais de transdução à regulação do ciclo celular (GONZALEZ-ASEGUINOLAZA et al., 2001). Recentemente, verificaram que a LACK da *L. mexicana*, pode ligar e aumentar a ativação do plasminogênio promovendo a formação de plasmina, sugerindo uma nova função que pode contribuir para a capacidade de invasão do parasita (GÓMEZ-ARREAZA et al., 2011).

3.4.3.8 Antígenos *L. major* stresse induzível 1 (*LmSTII*) e Antioxidante tiol específico (TSA)

O antígeno *LmSTII* foi identificado em isolados da *L. major* e codificado por um gene de cópia única altamente conservado em todo o gênero *Leishmania*. Além de ser constitutivamente expressado tanto em promastigotas quanto amastigotas, esta proteína pode

ser regulada positivamente em promastigotas por mudança na temperatura (WEBB et al., 1997). O TSA, outro antígeno também identificado na *L. major*, foi sugerido como candidato a vacina devido à sua capacidade para induzir uma resposta Th1 em camundongos infectados por este parasita. Esta proteína, é conhecida por ser antigênica em ambos os sistemas murinos e humanos (WEBB et al., 1998)

Além disso, tanto a *LmSTI1* quanto o TSA têm sido testados em várias experiências de imunização, fornecendo resultados bastante variáveis. Foi verificado que estes antígenos juntos ou individualmente, induzem a proteção igualmente em murinos susceptíveis a *L. major* induzindo respostas específicas CD4⁺/Th1 quando juntos e CD8⁺ apenas com TSA (CAMPOS-NETO et al., 2002). Em modelos caninos infectados com *L. chagasi*, após imunização com os antígenos TSA, LeIF e *LmSTI1* os resultados apontaram uma resposta quase que exclusivamente Th1 (FUJIWARA et al., 2005).

3.4.3.9 Fator de iniciação eucariótico (LeIF)

É uma proteína de *Leishmania* homóloga ao fator de iniciação eucariótico eIF4A (CORDIN et al., 2006) e foi descrita originalmente como um adjuvante natural, do tipo Th1 e como um antígeno que induz resposta Th1 mediada por IL-12 pelos PBMCs de pacientes com leishmaniose (SKEIKY et al., 1995, 1998; BARHOUMI et al., 2006). Em *L. donovani*, o fator de alongamento 2 (LeIF-2) foi identificado como uma das proteínas imunoestimuladoras potentes. E o seu recombinante, rLeIF-2 foi capaz de estimular a produção *in vitro* de citocinas do tipo Th1 (IL-12 e IFN γ) em PBMCs de indivíduos normais e curados de LV, bem como, forneceu uma proteção considerável em hamsters infectados (KUSHAWAHA et al., 2011).

Também foi demonstrado, que a antigenicidade dos fragmentos desta proteína, eIF4A, homóloga da *L. infantum* em PBMCs humanas, onde os níveis de citocinas associados a Th1 pelos monócitos humanos foram elevados (BARHOUMI et al., 2011). Recentemente, em macrófagos murinos tratados com recombinantes LeIF (fator de iniciação eucariótico de *L. infantum*)/IFN γ , foi observado uma inibição no crescimento intracelular do parasita através de mecanismos que envolvem NO e ROS mediado por TNF- α e MIP-1 α (proteína inflamatória de macrófago 1 α) (KOUTSONI et al., 2014).

3.4.3.10 Antígenos Lcr1 e Ldp23

O Lcr1 é um antígeno de amastigota de *L. chagasi* que estimula *in vitro*, células T de esplenócitos murinos a secretar citocinas do tipo Th1/IFN γ , mas não do tipo Th2, isto sugere que o Lcr1 tem o potencial de influenciar a resposta imune do hospedeiro (WILSON et al., 1995). Recentemente, um estudo comparativo entre as sequências do gene, Lcr1, a partir de isolados de *L. infantum* de regiões geográficas diferentes, mostraram alta identidade, sugerindo um possível uso clínico em potencial para o diagnóstico da leishmaniose por meio de detecção de anticorpos (MAHMOUDZADEH-NIKNAM et al., 2010; NIKNAM et al., 2014). Outro antígeno interessante é o Ldp23, uma proteína presente na superfície de promastigota de *L. donovani* que é conhecida por acelerar *in vitro* a produção de IFN γ , enquanto inibe a produção de IL-4 em macrófagos murinos (CAMPOS-NETO, 1995).

3.5 Diagnóstico e tratamento da LV. Novas perspectivas?

O diagnóstico da LV é complexo, pois suas características clínicas assemelham-se com outras doenças, como a malária e febres entéricas (SUNDAR; RAI, 2002). Atualmente, o padrão ouro para o diagnóstico baseia-se na visualização da forma amastigota do parasita em macrófagos através do exame microscópico de aspirados de tecidos (baço, medula óssea ou nódulos linfáticos) (SRIVASTAVA et al., 2011). No Brasil, o teste parasitológico de aspirado de medula óssea é o mais recomendado, seguido pelo isolamento do parasita em meio de cultura (*in vitro*) (MS, 2006).

Em relação ao tratamento da LV, os antimoniais pentavalentes, ainda continuam sendo o tratamento de primeira linha, apesar dos efeitos adversos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Em algumas regiões endêmicas, como Bihar na Índia, devido ao desenvolvimento de resistência aos antimônios, a anfotericina B, é a primeira escolha (CROFT; OLLIARO, 2011). Além disso, outras drogas estão em uso como a miltefosina (BHATTACHARYA et al., 2007) e paromomicina (SUNDAR et al., 2011).

O desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose, tem sido uma prioridade por muitos anos (SCHROEDER; AEBISCHER, 2011). Várias formulações de vacinas, incluindo parasitas mortos, vivos atenuados, proteínas recombinantes de *Leishmania* ou DNA codificador de proteínas, bem como moduladores imunológicos da saliva do flebótomo já foram examinados (KEDZIERSKI; ZHU; HANDMAN, 2006). Atualmente, com a disponibilidade da sequência completa do genoma de várias espécies de *Leishmania*,

perspectivas promissoras para o estudo de novas moléculas como candidatas a vacinas, tais como, os vários exemplos de FV, aqui descritos (SINGH; SUNDAR, 2012).

Entre eles, a proteína A2, vem se destacando com resultados promissores para o desenvolvimento de uma vacina para a LV humana (FERNANDES et al., 2012). A imunogenicidade e imunidade protetora contra a infecção por *L. chagasi* com uma formulação contendo a proteína recombinante rA2, foi avaliada em cães vacinados. Os resultados mostraram um aumento significativo dos níveis de anticorpos (IgG total e IgG2) e IFN- γ além de baixo nível de IL-10 com limitação na replicação do parasita e prevenção da doença grave (FERNANDES et al., 2008).

ALVES et al. (2009), avaliando linfonodos de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* observaram que a CP em cães sintomáticos foi 73 vezes maior, além, da elevada expressão de IL-10 e TGF- β sugerindo que estas citocinas são importantes na progressão da doença. Já nos cães assintomáticos, verificaram níveis de expressão de IFN γ e TNF- α elevados e CP mais baixa, indicando que estas citocinas desempenham um papel na proteção contra a infecção.

No Brasil, a formulação da vacina recombinante da proteína A2 (Leish-Tec®) foi licenciada, sendo a terceira vacina profilática contra LVC, mas a primeira recombinante comercializada no mundo (FERNANDES et al., 2012). Recentemente, regimes de imunização em primatas à base de rA2 (Ad5-A2) seguido por rA2/rhIL-12 (Interleucina 12 humana recombinante/adsorvida em alúmen) foi avaliado e apresentaram após a infecção com *L. infantum*, uma notável proteção clínica (GRIMALDI et al., 2014). Estes resultados tem aproximado a perspectiva de desenvolvimento da vacina contra LV humana uma realidade cada vez mais próxima.

3.6 Organização genômica da *Leishmania*

Os genomas de múltiplos tripanossomatídeos foram sequenciados (BERRIMAN, 2005; GINGER, 2005; PEACOCK et al., 2007) e estão disponíveis a partir de fontes como o GeneDB (<http://GeneDB.org>) (HERTZ-FOWLER et al., 2004; ASLETT et al., 2009) e fornecem importantes contribuições sobre a biologia dos tripanossomatídeos e projetos cruciais para as investigações em larga escala (CHOI; EL-SAYED, 2012). Apesar dos tripanossomatídeos divergirem há 200-500 milhões de anos atrás (OVERATH et al., 2001; DOUZERY et al., 2004), antecedendo o surgimento dos mamíferos (O'BRIEN, 1999), os genomas das espécies são altamente sintênicos, ou seja, mostram uma conservação na ordem dos genes (EL-SAYED, 2005). Aproximadamente nas 30 espécies de *Leishmanias* a ordem e

a sequência dos genes são bastante conservadas (IVENS et al., 2005; DÁVILA LÓPEZ; MARTÍNEZ GUERRA; SAMUELSSON, 2010; JACKSON, 2015).

As espécies de *Leishmania* do Velho Mundo (grupo da *L. donovani*, *L. infantum* e *L. major*) têm 36 pares de cromossomos variando 0,28-2,8 Mb (Mega bases), ao passo que as espécies do Novo Mundo têm 34 cromossomos com fusão entre os cromossomos 8 + 29 e 20 + 36 no complexo da *L. mexicana* e 35 cromossomos com fusão do cromossomo 20 + 34 no complexo da *L. braziliensis* (WINCKER et al., 1996; MYLER et al., 2000; IVENS et al., 2005). A *L. major* (MHOM/IL/81/Friedlin) foi a primeira espécie a ser sequenciada e forneceu o modelo para as análises genômicas posteriores (SMITH; PEACOCK; CRUZ, 2007), com um genoma diplóide (IOVANNISCI; BEVERLEY, 1989; CRUZ; COBURN; BEVERLEY, 1991; CRUZ; TITUS; BEVERLEY, 1993; REQUENA, 2011) de aproximadamente 32.8 Mb e um total de 911 genes de RNA, 39 pseudogenes e 8.272 genes codificadores de proteínas (IVENS et al., 2005; KAZEMI, 2011). Mesmo num contexto de conteúdo conservado de genes, sintenia e arquitetura, foi identificado cerca de 200 diferenças ao nível de conteúdo de gene ou pseudogene, incluindo 78 genes que são restritos a espécies individuais mostrando diferenças significativas em relação ao genoma da *L. major*. A *L. infantum* apresentou o tamanho do genoma de 32.1 Mb com uma correspondência de 98% em relação ao genoma de referência (*L. major*) além de 8.195 genes (8.154 genes codificadores e 41 pseudogenes) (PEACOCK et al., 2007).

A organização dos genes nos tripanossomatídeos ocorre em grandes agrupamentos de genes policistrônicos (PGCs), isto é, dezenas a centenas de genes codificadores de proteínas dispostos consecutivamente (*in tandem*) na mesma fita de DNA, comparáveis às unidades policistrônicas em procariotos, exceto que, os genes presentes não codificam proteínas funcionalmente relacionadas (CLAYTON, 2002; CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003; IVENS et al., 2005). Além disso, alguns genes estão presentes como múltiplas cópias, também como um mecanismo direto para aumentar a abundância do transcrito de proteínas constitutivamente expressadas, tais como as tubulinas, proteínas de choque térmico, proteases, transportadores de glicose e antígenos de superfície, entre outras (REQUENA, 2011). Este modo de organização de gene incomum, foi observado pela primeira vez no cromossomo 1 da *L. major*, que contém 85 genes organizados em duas PGCs divergentes, com os primeiros 32 genes agrupados na fita de baixo e os 53 genes restantes agrupados na fita de cima (MYLER et al., 1999; WORTHEY et al., 2003; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010).

3.7 Transcrição e processamento pós transcricional.

A transcrição nos tripanossomatídeos é iniciada entre dois agrupamentos de genes divergentes separados por curtas sequências de umas poucas quilobases denominadas de regiões de alternância de fitas para produzir pré-mRNAs policistrônicos que serão posteriormente processados (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2003; HAILE; PAPADOPOULOU, 2007; REQUENA, 2011). Com exceção do promotor do gene da sequência líder “spliced leader (SL)”, nenhum promotor reconhecido pela RNA polimerase II foi identificado, e somente alguns fatores de transcrição foram descritos (CRIBB; SERRA, 2009). Uma vez que o pré-mRNA policistrônico é produzido, duas reações acopladas permitem a geração de transcritos monocistrônicos maduros: trans-splicing e poliadenilação (TEIXEIRA; DA ROCHA, 2003; ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011). Na reação de trans-splicing, um pequeno RNA (mini-éxon) de 39 a 41 nucleótidos, o RNA “Spliced Leader” (RNA-SL) fornece uma estrutura de cobertura denominada “CAP” que constitui uma 7-metilguanossina (m^7G), que é adicionada através de uma reação de transesterificação ao terminal 5’ de todos os RNAs codificadores de proteínas conhecidos, já no terminal 3’ ocorre a clivagem e a poliadenilação (Figura 4) (BANGS et al., 1992; TEIXEIRA, 1998; CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003; LIANG et al., 2003;)

Ainda considerando o processamento nestes tripanossomatídeos, de fato, não há um sinal de consenso específico que permita a escolha do local do processamento. Vários estudos têm demonstrado que regiões ricas em polipirimidina dentro das regiões intergênicas parecem guiar o SL e a poliadenilação, resultando na geração de mRNA maduro (HARTMANN et al., 1998; HUMMEL; GILLESPIE; SWINDLE, 2000; ARAÚJO TEIXEIRA, 2011). Outra característica interessante destes protozoários é que a grande maioria dos seus genes codificadores de proteínas não possuem íntrons, e a única exceção até agora é o gene codificador da Poli (A) polimerase (MAIR et al., 2000).

3.8 Regulação da expressão gênica.

Todos os genes que fazem parte de um PGC são transcritos no mesmo nível, como consequência da transcrição policistrônica. No entanto, os mRNAs maduros de genes adjacentes podem mostrar concentrações muito diferentes e/ou expressão estágio-específica, pois a expressão de genes em tripanossomatídeos é regulada principalmente pós-transcricionalmente ao nível de processamento e estabilidade do mRNA (CLAYTON, 2002; HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

A *Leishmania* (e outros tripanossomatídeos) parece ter perdido, ou nunca adquiriu, a capacidade de regular a iniciação da transcrição de seus genes individuais (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010) que se deve a quase ausência de promotores para a RNA polimerase II. Nesta situação, os tripanossomatídeos tem mecanismos alternativos potenciais para regular a expressão dos seu genes, como o processamento diferencial de transcritos policistrônicos, regulação da estabilidade do mRNA e tradução, regulação pós-traducional e da meia-vida da proteína (REQUENA, 2011).

Um aspecto interessante, é a plasticidade genômica da *Leishmania* que em condições de estresse pode tanto amplificar regiões cromossômicas como cromossomos inteiros, além de, também, induzir a perda de cromossomo como uma estratégia de emergência para a sua sobrevivência e assim permitindo uma maior expressão de proteínas específicas para lidar com situações estressantes (BEVERLEY, 1991; DUJARDIN, 2009; LEPROHON et al., 2009). Outra característica notável é que os genes repetidos mostram uma considerável conservação nas regiões codificantes, mas divergências significativas nas regiões não traduzíveis (UTRs) (REQUENA, 2011).

Isso se reflete no desenvolvimento da *Leishmania* onde os níveis de expressão dos genes estão atrelados as fases do seu crescimento, como visto em um estudo (RAMAMOORTHY et al., 1992; YAO; DONELSON; WILSON, 2003), em que a gp63 (Glicoproteína 63) ou MSP (Major Surface Protease), uma abundante protease de superfície que é codificada por pelo menos 18 genes dispostos “*in tandem*” na *L.chagasi*, a expressão dos seus mRNAs se dividem em três classes (*MSPL*, *MSPS*, *MSPC*) de acordo com as suas 3'UTRs únicas e expressão diferencial durante o ciclo de vida do parasita. Ou seja, os mRNAs do gene *MSPL* são expressados predominantemente na fase logarítmica da curva de crescimento da promastigota, os mRNAs do *MSPS* são exclusivamente expressados na fase estacionária e os mRNAs do *MSPC* são constitutivamente expressados ao longo de ambas as fases de crescimento (RAMAMOORTHY et al., 1992).

Considerando que sequências nas 3'UTRs de mRNAs desempenham um papel chave na expressão de genes, foi demonstrado (BOUCHER et al., 2002) que, nas 3'UTRs dos mRNAs dos genes da amastina da *L. infantum* têm uma região de 450 pb (pares de bases) que confere uma expressão específica do gene para a forma amastigota por um mecanismo que aumenta a tradução do seu mRNA (BOUCHER et al., 2002). Assim, tanto os eventos de duplicação de genes e divergências nas seqüências regulatórias, 3'-UTR, podem ser encarados como uma estratégia evolutiva seguida pela *Leishmania* para garantir uma adequada

expressão de um gene relevante durante as diferentes fases do ciclo de vida do parasita (REQUENA, 2011).

Outro mecanismo potencial para regular a expressão dos genes é a estabilização ou degradação do mRNA, que é dependente de fatores proteicos que reconhecem sequências ou motivos estruturais muitas vezes encontrados na 5' ou principalmente nas 3'UTR dos transcritos (MATA; MARGUERAT; BÄHLER, 2005). Esse controle pós-transcricional é mediado por várias combinações de proteínas ligadoras de RNAs (RBPs) que determinam o destino dos transcritos marcados e que parecem regular coordenadamente subconjuntos de mRNAs específicos (HIERONYMUS; SILVER, 2004; KEENE, 2007; GLISOVIC et al., 2008).

3.8.1 Controle da expressão gênica via processo traducional e modificações pós-traducionais.

A síntese de proteína é um processo indispensável na expressão do gene, e é um componente chave no seu controle (DIAZ-GUERRA et al., 2008; HERSHEY; SONENBERG; MATHEWS, 2012). A regulação dos genes através de um mecanismo de controle da tradução confere vantagens valiosas, incluindo a velocidade e uma resposta prontamente reversível às mudanças nas condições fisiológicas. Essa rapidez e versatilidade permite que as células modulem a composição da membrana, ativem vias de transduções de sinais, regulem a eficiência da tradução do mRNA de modo geral e específico, e se ajustem as novas necessidades do metabolismo energético e de nutrientes quando novas condições mudam ditando novas necessidades (PAPADOPOULOU et al., 2003).

Devido a grande maioria dos mRNAs eucarióticos terem meia-vidas bastante longas (> 2 h) a regulação rápida dos níveis celulares de proteínas que eles codificam devem ser alcançadas através do controle da eficiência traducional dos seus mRNA e das taxas de degradação de proteínas (RAGHAVAN, 2002). Após exportação do núcleo, nem todos os mRNAs entram imediatamente no *pool* ativo da tradução. Muitos são mantidos em um estado de repouso traducional ou em uma localização subcelular adequada aguardando algum sinal para o tempo certo da produção das proteínas (MATA; MARGUERAT; BÄHLER, 2005; ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011). De modo geral, duas formas de controle da tradução podem ser previstas: o controle global, em que a tradução da maioria dos mRNAs na célula é regulado; e o controle específico do mRNA pelo qual a tradução de um grupo específico de mRNAs é modulado sem afetar a biossíntese geral de proteínas ou o estado de tradução do transcriptoma celular como um todo (GEBAUER; HENTZE, 2004).

A regulação global, geralmente ocorre por alterações no estado de fosforilação dos fatores de iniciação da tradução e pelo o ajuste do número de ribossomos disponíveis. Já a regulação transcrito-específica, em geral é mediada pelos sinais dos *cis* elementos (*cis action*) nas 5' ou 3'UTRs dos mRNAs alvos e a ligação com as proteínas, *trans* elementos (*trans action*), ligadoras de RNAs, (KUERSTEN; GOODWIN, 2003). Desse modo, o processamento pós-transcricional, a localização celular, estabilização e degradação, e a taxa de tradução específica dos mRNAs são mediadas por fatores que atuam em *trans* (*trans action*) que tanto específico como dinamicamente reconhecem e se ligam ao mRNA (LUNDE; MOORE; VARANI, 2007).

A regulação a nível traducional foi demonstrada pela regulação da expressão dos genes das histonas em *Leishmania* (SOTO et al., 2000, 2004). As histonas são proteínas extremamente conservadas, e importantes na organização e na função do DNA do núcleo eucariótico (OSLEY, 1991). Foi demonstrado, que a síntese de proteína histona por *L. infantum* está fortemente acoplada à replicação do DNA, e é regulada por um mecanismo que envolve uma repressão da tradução dos mRNAs das histonas quando na ausência da síntese de DNA (SOTO et al., 2000, 2004). Também foi demonstrado, que as regiões não traduzíveis (3'UTR) dos genes das histonas *H2A*, são essenciais na regulação da tradução dos mRNAs das histonas durante o ciclo celular na *Leishmania* (ABANADES et al., 2009). A regulação traducional ao nível das 3'UTRs também mostrou ser relevante na expressão de genes estágio-específico como os genes de choque térmico, *hsp70* e *hsp83* além dos genes da *gp63*, *gp46*, *A2*, *amastina*, *transportador de glicose*, *PFR2C* (MURRAY et al., 2007).

As modificações pós-tradução (MPT) de proteínas, também apresentam uma relevante contribuição para o controle da expressão do gene. Assim, as MPTs têm um efeito direto sobre a estabilidade e *turnover*, localização subcelular, e atividade das proteínas. A fosforilação, metilação, acetilação, glicosilação, piroglutamilação N-terminal, desamidação, oxidação do triptofano são MPTs descritas que ocorrem em *Leishmania* e tripanossomatídeos relacionados (CUERVO; DOMONT; DE JESUS, 2010).

Entre as possíveis MPTs, a fosforilação de proteínas celulares é o mecanismo fundamental para controlar o desenvolvimento em tripanossomatídeos e diversas espécies eucarióticas, principalmente em relação ao crescimento celular, diferenciação e transformação. (DELL; ENGEL, 1994; BRECHLEY et al., 2007; NETT et al., 2009). Vários peptídeos com aminoácidos modificados pós-traducionalmente foram identificados através de técnicas de larga escala, cujas principais modificações foram fosforilações, metilações, acetilações e glicosilações. Além disso, também foi determinado a abundância

relativa das MPTs que variaram durante a diferenciação entre promastigotas e amastigotas (ROSENZWEIG et al., 2008).

3.9 Expressão diferencial dos genes ao longo das fases do ciclo de vida

A transformação de promastigotas em amastigotas na *Leishmania* durante a infecção dos macrófagos do hospedeiro parece envolver uma série de etapas. Estas medidas não só resultam em transformações morfológicas, mas também permitem a sobrevivência dentro do vacúolo parasitóforo (LI et al., 2008). Pouco se sabe acerca dos processos moleculares que medeiam a diferenciação de promastigota em amastigota, mas é provável que a exposição à alta temperatura e do pH do ambiente intralisossomal inicia uma série de alterações na expressão de genes que levam às alterações morfológicas associadas (SAXENA et al., 2007). Em uma análise, foi demonstrado que durante a diferenciação de promastigotas de *L. donovani* em amastigotas, uma família de proteínas A2 foram expressas, dentro de uma hora de exposição ao ambiente intralisossomal e em 5 h elas começaram a se transformar na forma de células amastigotas (SAXENA et al., 2007).

Portanto, sinais ambientais, como a queda de pH e aumento acentuado de temperatura, desencadeiam a diferenciação celular mesmo que as células sejam cultivadas em sistemas de culturas axênicas. O choque térmico na *Leishmania* induz várias chaperonas e proteínas de choque térmico, incluindo Hsp70, Hsp83, e Hsp100. O choque térmico pode causar o enrolamento incorreto de uma fração de proteínas da célula, alterando assim a regulação de genes ao nível da transcrição e tradução (PAPADOPOULOU et al., 2003).

Além disso, o crescimento de tais parasitas em pH ácido induz rapidamente a regulação traducional controlada pelo elemento de 450 nucleotídeos das 3'UTRs dos mRNAs específicos de amastigotas, incluindo o gene *amastina*, vários genes homólogos da amastina, e o gene A2. Assim, aparentemente o pH ácido é um importante sinal para iniciar o controle traducional dependente do elemento de 450-nt nas 3' UTRs (PAPADOPOULOU et al., 2003). Na *Leishmania*, e tripanossomatídeos relacionados, estas regiões flanqueadoras (em grande parte as 3'-UTRs) tem sido envolvidas na regulação a nível de estado estacionário e estado traducional de mRNAs específicos ao longo do ciclo celular e nas diferentes fases do ciclo de vida (REQUENA, 2011; KRAMER, 2012).

A fosforilação é também um importante mecanismo envolvido na recepção e mediação do sinal de diferenciação quando os parasitas são transmitidos e tem de se adaptar a um novo ambiente (PAAPE; AEBISCHER, 2011). Em uma análise por eletroforese bidimensional em gel diferencial (2D-DIGE) foi revelado (MORALES et al., 2010) diferenças

dramáticas nos perfis de fosforilações de proteínas através das principais fases infecciosas da *Leishmania*. As amastigotas apresentaram mais proteínas fosforiladas comparadas com as promastigotas, e a fosforilação era quase que exclusivamente em proteínas chaperonas, incluindo várias isoformas de Hsp90 membro da família Hsp83, vários membros da família Hsp70, proteínas induzidas por estresse STI1, ciclofilina, entre outras.

Vários estudos sobre o padrão de expressão gênica durante a diferenciação e desenvolvimento dos tripanossomatídeos têm revelado números consideráveis de genes regulados nestes organismos (HOLZER; MCMASTER FORNEY, 2006; COHEN-FREUE et al., 2007; LEIFSO et al., 2007; JENSEN et al., 2009), embora em algumas análises foram observadas respostas limitadas do transcriptoma em toda as fases do ciclo de vida (DEPLEDGE et al., 2009; CHOI; EL-SAYED, 2012;).

Com o avanço da informação da sequência do genoma, os microarranjos de DNA proporcionam uma plataforma analítica poderosa para a determinação da expressão do gene global baseado na quantificação dos níveis de mRNA. Uma variedade de microarranjos de DNA foram utilizadas para estudar a expressão de gene de *Leishmania* em diferentes estágios de desenvolvimento e as conclusões gerais destes estudos de microarranjos são que *a Leishmania* mostra uma limitada expressão de gene estágio-específico e a grande maioria dos genes são expressos constitutivamente em todos os estágios de vida (COHEN-FREUE et al., 2007; PAAPE; AEBISCHER, 2011).

Recentemente, o desenvolvimento de novos métodos de sequenciamento de alto rendimento do DNA, forneceu uma nova técnica tanto para o mapeamento quanto para a quantificação do transcriptoma. Este método, designado por RNA-Seq (Sequenciamento de RNA), tem vantagens claras sobre as abordagens existentes e é esperado para revolucionar a forma em que são analisados os transcriptomas eucarióticos. (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Este método, o RNA-Seq, não tem um limite superior para a quantificação, e se correlaciona com o número de sequências obtidas. (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Em um estudo, foi utilizado a metodologia RNASeq para quantificar o transcriptoma de promastigota de *L. major*, resultando em um total 10285 transcritos encontrados e os níveis relativos de expressão de cada um também foram determinados. A partir desses dados gerados é possível determinar a expressão diferencial de genes, quer ao longo do ciclo de vida ou entre diferentes espécies de *Leishmania* (RASTROJO et al., 2013).

3.10 Sequenciamento de nova geração (NGS)

A arte de determinar a seqüência do DNA é conhecida como sequenciamento de Sanger e depois de anos de aperfeiçoamento, em 1987, a Applied Biosystems produziu a primeira máquina automática para o sequenciamento (AB370) (LIU et al., 2012). Em seguida, 1998, surgiram os instrumentos de sequenciamento automático e softwares associados, que tornaram-se os principais instrumentos para a realização do Projeto Genoma Humano em 2001 (COLLINS; MORGAN; PATRINOS, 2003).

Este Projeto, destacou a importância da informação da seqüência em larga-escala e os desafios envolvidos no processo de aquisição. O desenvolvimento de novos métodos de alto rendimento, como o sequenciamento em paralelo, também conhecido como sequenciamento de nova geração (NGS), permitiu o seqüenciamento de milhões de fragmentos de DNA em paralelo (KRISEMAN et al., 2010). Essa nova tecnologia foi difundida por três plataformas de sequenciamento; a Roche/454 FLX (MARGULIES et al., 2005), a Illumina/Solexa Genome Analyzer (BENTLEY, 2006) e o Sistema SOLiD™/ABI SOLiD (Sequenciamento por Ligação e Detecção de Oligonucleotídeos) da Applied Biosystems (BIOSYSTEMS, 2010).

A Companhia Solexa/Illumina lançou em 2006, o sequenciador Genome Analyzer (GA), que adota a tecnologia de seqüenciamento por síntese (SBS) (MARDIS, 2008; KOBOLDT et al., 2012). Seguidamente no início de 2010, lançou o Illumina HiSeq 2000, que adota a mesma estratégia de sequenciamento que a GA (MINOCHE; DOHM; HIMMELBAUER, 2011; LIU et al., 2012) e o sistema HiSeq 2500, que também usa a tecnologia (SBS) e suporta o sequenciamento massivamente paralelo (ILLUMINA, 2015).

Esse sistema, HiSeq 2500, permite várias aplicações, tais como o sequenciamento (sequenciamento *de novo*) e o re-sequenciamento do genoma completo ou de regiões de interesse, a análise de perfis e regulação epigenética, perfil de metilação e análise de interações proteínas-ácidos nucleicos de todo o genoma, análises metagenômica por sequenciamento de comunidades microbianas inteiras para descobrir informações taxonômicas e funcionais importantes e análise do transcriptoma completo (*de novo*) e perfil de expressão gênica através da técnica RNA-Seq (ILLUMINA, 2015).

3.11 RNA-Seq: a tecnologia do sequenciamento do transcriptoma

O termo transcriptoma foi originado por Charles Auffray em 1996 para caracterizar conjuntos inteiros de transcritos gerado por uma célula ou população de células (PIÉTU et al.,

1999) e foi considerado que o transcriptoma consiste principalmente de RNA ribossomal (80-90%, rRNA), RNA de transferência (5-15%, tRNA), RNA mensageiro (2-4%, mRNA) e uma pequena fração de RNA intragênico (isto é, intrônico) e intergênico não codificante (1%, ncRNA) com funções de regulação indefinidas (LINDBERG; LUNDEBERG, 2010). Várias tecnologias foram desenvolvidas para caracterizar o transcriptoma de uma população de células, técnicas à base de hibridização tais como: Northern blot (BECKMANN et al., 2010), RT-PCR (OUAKAD et al., 2007; NAGALAKSHMI et al., 2008) e microarranjos (SCHENA et al., 1995; COBB, 2006; MALONE; OLIVER, 2011) e técnicas baseadas em sequências de marcadores/etiquetas (tags) de cDNA, como o sequenciamento de Sanger (NAGALAKSHMI; WAERN; SNYDER, 2010) e bibliotecas de sequências expressas marcadas (ESTs) (VERDUN et al., 1998; AVILA et al., 2011), SAGE (LIMA NETO, 2012), CAGE (KODZIUS et al., 2006) e o MPSS (BRENNER et al., 2000).

O uso de NGS para obter dados transcriptômicos é conhecido coletivamente como sequenciamento profundo de RNA (RNA deep sequencing) ou RNA-Seq (NOWROUSIAN, 2010) e em 2008 foi publicado os primeiros estudos utilizando esta técnica (NAGALAKSHMI et al., 2008; WILHELM et al., 2008). Todos os instrumentos das plataformas são capazes de realizar o RNA-Seq, mas a partir da perspectiva do sequenciamento do transcriptoma do grande genoma, existem três instrumentos que têm sido amplamente utilizados: o Illumina Genome Analyzer/HiSeq, o da Life Technologies SOLiD e da Roche 454 (HITZEMANN et al., 2013). Em um estudo, foi demonstrado que em 22 trabalhos sobre RNA-Seq em mamíferos, foi verificado que 16 deles utilizaram a plataforma da Illumina GA, 3 usaram a ABI SOLiD, e 2 utilizaram a Roche 454 (COSTA et al., 2010).

A plataforma Illumina, tem-se destacado pela sua utilização na realização do sequenciamento em vários trabalhos publicados, em especial, o seu uso para as análises do transcriptoma de tripanossomatídeos. Sendo que, a primeira análise abrangente do transcriptoma de um parasita do gênero *Leishmania* usando a tecnologia de larga-escala para o sequenciamento do RNA (RNA-Seq) identificou 1884 novos transcritos em relação aos previamente anotados e seus dados também indicaram que as anotações atuais poderiam modificar muitos genes e que há uma extensa heterogeneidade nos sítios de processamento dos transcritos (extremidades 5' e 3') (RASTROJO et al., 2013).

Foi determinado um mapa genômico a partir da resolução de nucleotídeo únicos do transcriptoma do *T. brucei*, o agente causador da tripanossomíase africana, acrescentando 1.114 novos transcritos, incluindo 103 RNAs não-codificantes, confirmando e corrigindo muitas das características já previamente anotadas no seu transcriptoma e revelando uma

extensa heterogeneidade das extremidades 5' e 3'. Esse estudo, mostrou que o RNA-Seq, foi sensível o suficiente para detectar transcritos de supostos sítios de iniciação da transcrição pela Polimerase II (KOLEV et al., 2010). Além disso, outras investigações com diferentes cepas de *T. brucei*, bem como diferentes abordagens para evitar RNAs ribossomais (sequenciamento de rRNAs) e para identificar sítios aceptores de splice e sítios de poliadenilação foram também realizados com esta tecnologia (KOLEV et al., 2010).

Além das análises dos dados do sequenciamento de larga-escala não só permitem a identificação de novos transcritos e conduzir para a re-anotação de muitos sítios de iniciação da tradução, também podem ser usados para quantificar níveis de transcritos e identificar os genes que são regulados de um modo dependente do ciclo de vida (NILSSON et al., 2010; VEITCH et al., 2010; SIEGEL et al., 2010, 2011). Dessa forma, é possível que essa tecnologia avançada, promova um refinamento mais substancial para a compreensão dos mecanismos desenvolvidos por estes parasitas, que favorecem o seu estabelecimento na infecção através da interação parasita-hospedeiro. A expressão diferencial dos genes nas *Leishmanias* correlacionam com a modulação dinâmica da adaptação destes organismos aos seus hospedeiros (ALCOLEA et al., 2010).

4. Referências Bibliográficas

- ABANADES, D. R. et al. Key role of the 3' untranslated region in the cell cycle regulated expression of the *Leishmania infantum* histone H2A genes: minor synergistic effect of the 5' untranslated region. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 48, 2009.
- AFONSO, M. M. D. S. et al. Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Populations from Endemic Areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1–5, 2012.
- AGA, E. et al. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 898–905, 2002.
- AGUIRRE-GARCÍA, M. M. et al. *Leishmania major*: detection of membrane-bound protein tyrosine phosphatase. **Parasitology**, v. 132, n. 5, p. 641–9, 2006.
- ALCE, T. M. et al. Expression of hydrophilic surface proteins in infective stages of *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 102, n. 1, p. 191–196, 1999.
- ALCOLEA, P. J. et al. Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: High down-regulation rate in the amastigote stage. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 13, p. 1497–1516, 2010.
- ALLENBACH, C. et al. An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 3, p. 720–731, 2008.
- ALMEIDA-AMARAL, E. E. D et al. *Leishmania amazonensis*: Characterization of an ecto-phosphatase activity. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 4, p. 334–340, 2006.
- ALVES, C. F. et al. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349–358, 2009.
- ARANGO DUQUE, G. et al. *Leishmania* promastigotes induce cytokine secretion in macrophages through the degradation of synaptotagmin XI. **Journal of immunology**, v. 193, n. 5, p. 2363–72, 2014.
- ARANGO DUQUE, G.; FUKUDA, M.; DESCOTEAUX, A. Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages. **Journal of immunology**, v. 190, n. 4, p. 1737–1745, 2013.
- ARAÚJO, P. R.; TEIXEIRA, S. M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 257–266, 2011.
- ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae.

Nucleic Acids Research, v. 38, p. D457–D462, 2010.

ASSIS, R. R. et al. Glycoinositolphospholipids from leishmania braziliensis and L. infantum: Modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. 1–11, 2012.

AVILA, M. L. et al. Gene discovery in Triatoma infestans. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 39, 2011.

BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228–1231, 2000.

BADARO, R. et al. A Prospective Study of Visceral Leishmaniasis in an Endemic Area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 4, p. 639–649, 1986.

BANGS, J. D. et al. Spectrometry of mRNA. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 14, p. 9805–9815, 1992.

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

BARHOUMI, M. et al. Leishmania infantum LeIF protein is an ATP-dependent RNA helicase and an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast. **FEBS Journal**, v. 273, n. 22, p. 5086–5100, 2006.

BARHOUMI, M. et al. Leishmania infantum LeIF and its recombinant polypeptides modulate interleukin IL-12p70, IL-10 and tumour necrosis factor production by human monocytes. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 10, p. 583–588, 2011.

BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.

BATES, P. A. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 340–344, 2008.

BECKMANN, B. M. et al. Northern blot detection of endogenous small RNAs (~14 nt) in bacterial total RNA extracts. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 14, p. 2–11, 2010.

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

BELO, V. S. et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, p. e2182, 2013.

BELO, V. S. et al. Risk Factors for Adverse Prognosis and Death in American Visceral Leishmaniasis: A Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2982, 2014.

BENTLEY, D. R. Whole-genome re-sequencing. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 16, n. 6, p. 545–552, 2006.

- BERRIMAN, M. The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416–422, 2005.
- BEVERLEY, S. M. Gene Amplification in *Leishmania*. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 417–444, 1991.
- BHATTACHARYA, S. K. et al. Phase 4 Trial of Miltefosine for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 4, p. 591–598, 2007.
- BINNECK, E. As ômicas: Integrando a bioinformação. **Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento**, v. 32, p. 28–37, 2004.
- BIOSYSTEMS, A. Applied Biosystems SOLiD™ System BioScope™ Software for Scientists Guide. **Biosystems**, 2010.
- BLACHERE, N. E. et al. Heat Shock Protein-Peptide Complexes, Reconstituted In Vitro, Elicit Peptide-specific Cytotoxic T Lymphocyte Response and Tumor Immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 8, p. 1315–1322, 1997.
- BOUCHER, N. et al. A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19511–19520, 2002.
- BRAGA, A. S. DA C.; TOLEDO, A. C. DE C.; RABELLO, A. 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, n. 1, p. 55–59, 2013.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1. ed. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 2006.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Leishmania Visceral: Recomendações clínicas para redução da letalidade**. Série A. N ed. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. **Ministério da Saúde**, p. 120, 2014.
- BRENCHLEY, R. et al. The TriTryp Phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 434, 2007.
- BRENNER, S. et al. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 630–634, 2000.
- CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1231–1240, 2003.
- CAMPOS-NETO, A. Cloning and expression of a *Leishmania donovani* gene instructed by a peptide isolated from major histocompatibility complex class II molecules of infected

macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 5, p. 1423–1433, 1995.

CAMPOS-NETO, A. et al. Vaccination with Plasmid DNA Encoding TSA / LmSTI1 Leishmanial Fusion Proteins Confers Protection against Leishmania major Infection in Susceptible BALB / c Mice. **Society**, v. 70, n. 6, p. 2828–2836, 2002.

CARRILLO, E. et al. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 15, p. 1902–1911, 2008.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 3, p. 337–344, 2001.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. The damage-response framework of microbial pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17–24, 2003.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. **Journal of Water and Health**, v. 7, n. S1, p. S2, 2009.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 3703–3713, 1999.

CASTRO, H. et al. Two linked genes of Leishmania infantum encode tryparedoxins localised to cytosol and mitochondrion. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 137–147, 2004.

CHANDRA, H.; CHANDRA, S.; KAUSHIK, R. M. Visceral Leishmaniasis with Associated Common, Uncommon, and Atypical Morphological Features on Bone Marrow Aspirate Cytology in Nonendemic Region. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

CHANG, K. Molecular Determinants Of Leishmania Virulence. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 499–529, 1990.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. S7–S16, 2007.

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.

CHARMOY, M. et al. The Prominent Role of Neutrophils during the Initial Phase of Infection by Leishmania Parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1–8, 2010.

CHAUDHARY, R. et al. Immunomodulation in Human Dendritic Cells Leads to Induction of Interferon-Gamma Production by Leishmania donovani Derived KMP-11 Antigen via Activation of NF-B in Indian Kala-Azar Patients. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

CHAWLA, M.; VISHWAKARMA, R. A. Alkylacylglycerolipid domain of GPI molecules of

Leishmania is responsible for inhibition of PKC-mediated c-fos expression. **Journal of lipid research**, v. 44, n. 3, p. 594–600, 2003.

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an Emerging Infection. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, n. 3, p. 175–182, 2001.

CHOI, J.; EL-SAYED, N. M. Functional genomics of trypanosomatids. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 2-3, p. 72–79, 2012.

CLAYTON, C. E. NEW EMBO MEMBER'S REVIEW Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 8, p. 1881–1888, 2002.

COBB, B. Y. K. In a Vast Sea of Data. **Biomedical computation review**, v. 2, n. 4, p. 16–23, 2006.

COELHO-FINAMORE, J. M. et al. Leishmania infantum: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 3-4, p. 333–342, 2011.

COHEN-FREUE, G. et al. Global gene expression in Leishmania. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1077–1086, 2007.

COLLIN, S. et al. Conflict and Kala-azar: Determinants of Adverse Outcomes of Kala-azar among Patients in Southern Sudan. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 5, p. 612–619, 2004.

COLLINS, F. S.; MORGAN, M.; PATRINOS, A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 286–290, 2003.

CORDIN, O. et al. The DEAD-box protein family of RNA helicases. **Gene**, v. 367, n. 1-2, p. 17–37, 2006.

COSTA, A. S. A. et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p. 735–739, 2012.

COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2959–2963, 2008.

COSTA, C. H. N. et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 386–392, 2010a.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 361–372, 1990.

COSTA, D. L. et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and Global Health**, v. 107, n. 2, p. 78–87, 2013.

COSTA, V. et al. Uncovering the Complexity of Transcriptomes with RNA-Seq. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1–19, 2010b.

COURA-VITAL, W. et al. Prognostic Factors and Scoring System for Death from Visceral Leishmaniasis: An Historical Cohort Study in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3374, 2014.

CRIBB, P.; SERRA, E. One- and two-hybrid analysis of the interactions between components of the *Trypanosoma cruzi* spliced leader RNA gene promoter binding complex. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 5, p. 525–532, 2009.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1478–1483, 2011.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis Drug Resistance in Leishmaniasis. **Society**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CRUZ, A.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Double targeted gene replacement for creating null mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 16, p. 7170–7174, 1991.

CRUZ, A. K.; TITUS, R.; BEVERLEY, S. M. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 4, p. 1599–1603, 1993.

CRUZ, I. et al. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. **The Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1124–1125, 2002.

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

DÁVILA LÓPEZ, M.; MARTÍNEZ GUERRA, J. J.; SAMUELSSON, T. Analysis of Gene Order Conservation in Eukaryotes Identifies Transcriptionally and Functionally Linked Genes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. e10654, 2010.

DE PAIVA, R. M. C. et al. Amastin Knockdown in *Leishmania braziliensis* Affects Parasite-Macrophage Interaction and Results in Impaired Viability of Intracellular Amastigotes. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2015.

DE QUEIROZ SAMPAIO, M. J. A. et al. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. 1–5, 2010.

DELL, K. R.; ENGEL, J. N. Stage-specific regulation of protein phosphorylation in *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 64, n. 2, p. 283–292, 1994.

DENISE, H. et al. Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. **BMC Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 42, 2006.

DEPLEDGE, D. P. et al. Comparative Expression Profiling of *Leishmania*: Modulation in Gene Expression between Species and in Different Host Genetic Backgrounds. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 7, p. e476, 2009.

DEPLEDGE, D. P. et al. *Leishmania*-Specific Surface Antigens Show Sub-Genus Sequence Variation and Immune Recognition. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, p. e829, 2010.

- DESCHACHT, M. et al. Role of oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon Leishmania infection. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1429–1437, 2012.
- DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1455, n. 2-3, p. 341–352, 1999.
- DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Phagocytosis of Leishmania. **Advances in Cellular and Molecular Biology of Membranes and Organelles**, v. 6, p. 297–316, 1999.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.
- DIAZ-GUERRA, E. et al. Translation controlled mRNAs: new drug targets in infectious diseases? **Infectious disorders drug targets**, v. 8, n. 4, p. 252–261, 2008.
- DOUZERY, E. J. P. et al. The timing of eukaryotic evolution: Does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 43, p. 15386–15391, 2004.
- DRUZIAN, A. F. et al. Risk Factors for Death from Visceral Leishmaniasis in an Urban Area of Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 8, p. e0003982, 2015.
- DUJARDIN, J.-C. Structure, dynamics and function of Leishmania genome: Resolving the puzzle of infection, genetics and evolution? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 290–297, 2009.
- DUMAS, C. et al. Disruption of the trypanothione reductase gene of Leishmania decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. **EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2590–2598, 1997.
- EL-SAYED, N. M. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404–409, 2005.
- FARIA, M. S.; REIS, F. C. G.; LIMA, A. P. C. A. Toll-Like Receptors in Leishmania Infections: Guardians or Promoters? **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1–12, 2012.
- FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888–5895, 2008.
- FERNANDES, A. P. et al. Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 476–485, 2012.
- FORGBER, M. et al. Mapping the Antigenicity of the Parasites in Leishmania donovani Infection by Proteome Serology. **PLoS ONE**, v. 1, n. 1, p. e40, 2006.

FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 238–245, 2010.

FUJIWARA, R. T. et al. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTII) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 36, n. 5-6, p. 827–838, 2005.

GANTT, K. R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of immunology**, v. 167, n. 2, p. 893–901, 2001.

GEBAUER, F.; HENTZE, M. W. Molecular mechanisms of translational control. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 10, p. 827–835, 2004.

GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, v. 20, n. 1-2, p. 59–66, 2001.

GINGER, M. L. Trypanosomatid Biology and Euglenozoan Evolution: New Insights and Shifting Paradigms Revealed through Genome Sequencing. **Protist**, v. 156, n. 4, p. 377–392, 2005.

GLISOVIC, T. et al. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. **FEBS Letters**, v. 582, n. 14, p. 1977–1986, 2008.

GÓMEZ-ARREAZA, A. et al. *Leishmania mexicana*: LACK (*Leishmania* homolog of receptors for activated C-kinase) is a plasminogen binding protein. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 4, p. 752–761, 2011.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G. et al. Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, n. 3, p. 909–917, 2001.

GONZALEZ-LEAL, I. J. et al. Cathepsin B in Antigen-Presenting Cells Controls Mediators of the Th1 Immune Response during *Leishmania major* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3194, 2014.

GORAK, P. M. A; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 2, p. 687–695, 1998.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.

GRECH, V. et al. Visceral leishmaniasis in Malta--an 18 year paediatric, population based study. **Archives of disease in childhood**, v. 82, n. 5, p. 381–5, 2000.

GRIMALDI, G. et al. Clinical and Parasitological Protection in a *Leishmania infantum*-Macaque Model Vaccinated with Adenovirus and the Recombinant A2 Antigen. **PLoS**

- Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2853, 2014.
- HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 569–577, 2007.
- HALLÉ, M. et al. The Leishmania surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38mitogen-activated protein kinase inactivation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 11, p. 6893–6908, 2009.
- HAMMOUDEH, N. et al. Sequencing and Gene Expression Analysis of Leishmania tropica LACK Gene. **Iran J Parasitol**, v. 9, n. 4, p. 574–583, 2014.
- HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011.
- HARTMANN, C. et al. Effect of multiple downstream splice sites on polyadenylation in Trypanosoma brucei. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 149–152, 1998.
- HASSANI, K. et al. Absence of Metalloprotease GP63 Alters the Protein Content of Leishmania Exosomes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95007, 2014.
- HELLAL, M.; KUNDU, S. Visceral leishmaniasis involving the bone marrow. **Blood**, v. 122, n. 5, p. 627–627, 2013.
- HERSHEY, J. W. B.; SONENBERG, N.; MATHEWS, M. B. Principles of Translational Control: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 12, p. a11528–a11528, 2012.
- HERTZ-FOWLER, C. et al. GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 1, p. D339–D343, 2004.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.
- HIERONYMUS, H. A systems view of mRNP biology. **Genes & Development**, v. 18, n. 23, p. 2845–2860, 2004.
- HITZEMANN, R. et al. Genes, behavior and next-generation RNA sequencing. **Genes, Brain and Behavior**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2013.
- HOLZER, T. R.; MCMASTER, W. R.; FORNEY, J. D. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in Leishmania mexicana. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 198–218, 2006.
- HUMMEL, H. S.; GILLESPIE, R. D.; SWINDLE, J. Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 45, p. 35522–35531, 2000.
- IBRAIM, I. C. et al. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from Leishmania braziliensis and Leishmania infantum trigger different innate immune responses in murine

macrophages. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 54, 2013.

ILG, T. et al. Purification and structural characterization of a filamentous, mucin- like proteophosphoglycan secreted by Leishmania parasites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 35, p. 21583–21596, 1996.

ILGS, T. et al. O- and N-Glycosylation of the Leishmania mexicana-secreted Acid Phosphatase. Characterization of a new class of phosphoserine-linked glycans. **Biochemistry**, v. 269, n. 39, p. 24073–24081, 1994.

ILLUMINA, I. **HiSeq 2500 Sequencing Technology**. Disponível em: <http://www.illumina.com/systems/hiseq_2500_1500/technology.html>.

IOVANNISCI, D. M.; BEVERLEY, S. M. Structural alterations of chromosome 2 in Leishmania major as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 34, n. 2, p. 177–188, 1989.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

IYER, J. P. et al. Crucial role of cytosolic trypanothione peroxidase in Leishmania donovani survival, drug response and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 372–391, 2008.

JACKSON, A. P. Genome evolution in trypanosomatid parasites. **Parasitology**, v. 142, n. S1, p. S40–S56, 2015.

JENSEN, B. C. et al. Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of Trypanosoma brucei. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 482, 2009.

JERONIMO, S. M. B. et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 386–388, 1994.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, 2006.

KAUR, J.; KAUR, T.; KAUR, S. Studies on the protective efficacy and immunogenicity of Hsp70 and Hsp83 based vaccine formulations in Leishmania donovani infected BALB/c mice. **Acta Tropica**, v. 119, n. 1, p. 50–56, 2011.

KAVOOSI, G. et al. Leishmania major: Effects of proteophosphoglycan on reactive oxygen species, IL-12, IFN γ and IL-10 production in healthy individuals. **Experimental Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 62–66, 2008.

KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S. K.; KARIMINIA, A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to Leishmania major phosphoglycans (PGs). **Parasitology**, v. 136, n. 10, p. 1193–1199, 2009.

KAZEMI, B. Genomic organization of Leishmania species. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 6, n. 3, p. 1–18, 2011.

- KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1544–1562, 2014.
- KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. Leishmania vaccines: progress and problems. **Parasitology**, v. 133, n. S2, p. S87, 2006.
- KEENE, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 7, p. 533–543, 2007.
- KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 901–915, 2014.
- KOBOLDT, D. C. et al. Genomic Structural Variants. **Methods Mol Biol**, v. 838, n. 6, p. 1–14, 2012.
- KODZIUS, R. et al. CAGE: cap analysis of gene expression. **Nature methods**, v. 3, n. 3, p. 211–222, 2006.
- KOLEV, N. G. et al. The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, p. 1–15, 2010.
- KOUTSONI, O. et al. Leishmania eukaryotic initiation factor (LeIF) inhibits parasite growth in murine macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.
- KRAMER, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 181, n. 2, p. 61–72, 2012.
- KRISEMAN, J. et al. BING: Biomedical informatics pipeline for Next Generation Sequencing. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 43, n. 3, p. 428–434, 2010.
- KROPF, P. et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, n. 8, p. 1000–1002, 2005.
- KUERSTEN, S.; GOODWIN, E. B. The power of the 3' UTR: translational control and development. **Nature reviews. Genetics**, v. 4, n. 8, p. 626–637, 2003.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–10, 2012.
- KUMARI, S. et al. Discovery of Novel Vaccine Candidates and Drug Targets Against Visceral Leishmaniasis Using Proteomics and Transcriptomics. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 11, p. 938–947, 2008.
- KURKJIAN, K. M. et al. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. **Cytometry Part A**, v. 69A, n. 5, p. 353–358, 2006.
- KUSHAWAHA, P. K. et al. Elongation factor-2, a Th1 stimulatory protein of *Leishmania donovani*, generates strong IFN- γ and IL-12 response in cured *Leishmania*-infected

patients/hamsters and protects hamsters against *Leishmania* challenge. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 12, p. 6417–27, 2011.

LACERDA, D. I. et al. Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 238–245, 2012.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

LANG, T.; LECOEUR, H.; PRINA, E. Imaging *Leishmania* development in their host cells. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 10, p. 464–473, 2009.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.

LAUFS, H. et al. Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. **Society**, v. 70, n. 2, p. 826–835, 2002.

LAUNOIS, P. et al. Different epitopes of the LACK protein are recognized by V β 4 V α 8 CD4⁺ T cells in H-2b and H-2d mice susceptible to *Leishmania major*. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 11, p. 1260–1266, 2007.

LAURENTI, M. D. et al. The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 427–434, 2004.

LEIFSO, K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, n. 1, p. 35–46, 2007.

LEPROHON, P. et al. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 5, p. 1387–1399, 2009.

LI, Q. et al. Comparison of the expression profiles of promastigotes and axenic amastigotes in *Leishmania donovani* using serial analysis of gene expression. **Parasitology Research**, v. 103, n. 4, p. 821–828, 2008.

LIANG, X. -H. et al. trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 830–840, 2003.

LIMA NETO, A. S.; DE MELO NETO, O. P.; COSTA, C. H. N. Application of Serial Analysis of Gene Expression to the Study of the Gene Expression Profile of *Leishmania infantum chagasi* Promastigote. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

LINCOLN, L. M. et al. Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46)

restores their resistance to lysis by complement. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 185–189, 2004.

LINDBERG, J.; LUNDEBERG, J. The plasticity of the mammalian transcriptome. **Genomics**, v. 95, n. 1, p. 1–6, 2010.

LIU, L. et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

LOKE, P. et al. IL-4 dependent alternatively activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. **BMC Immunology**, v. 3, n. 1, p. 7, 2002.

LUNDE, B. M.; MOORE, C.; VARANI, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 6, p. 479–490, 2007.

LYONS, S.; VEEKEN, H.; LONG, J. Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, n. 8, p. 733–739, 2003.

MACFARLANE, J. et al. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. **European Journal of Biochemistry**, v. 190, n. 2, p. 377–384, 1990.

MACLEAN, L. M. et al. Trafficking and release of *Leishmania* metacyclic HASPB on macrophage invasion. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 740–761, 2012.

MAHMOUDZADEH-NIKNAM, H. et al. Complete conservation of an immunogenic gene (*lcr1*) in *Leishmania infantum* and *Leishmania chagasi* isolated from Iran, Spain and Brazil. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 47, n. 4, p. 204–210, 2010.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941–2947, 2008.

MAIR, G. et al. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v. 6, n. 2, p. 163–169, 2000.

MALONE, J. H.; OLIVER, B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. **BMC Biology**, v. 9, n. 1, p. 34, 2011.

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in Genetics**, v. 24, n. 3, p. 133–141, 2008.

MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376–380, 2005.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Transcription of *Leishmania major* Friedlin Chromosome 1 Initiates in Both Directions within a Single Region. **Molecular Cell**, v. 11, n. 5, p. 1291–1299, 2003.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. et al. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1–15, 2010.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Mortality and Case Fatality Due to Visceral Leishmaniasis in

Brazil: A Nationwide Analysis of Epidemiology, Trends and Spatial Patterns. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93770, 2014.

MASLOV, D. A.; PODLIPAEV, S. A.; LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 397–402, 2001.

MATA, J.; MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 9, p. 506–514, 2005.

MAURER, M.; DONDJI, B.; VON STEBUT, E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 198, n. 3, p. 137–146, 2009.

MAURICIO, I. L. et al. Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World Leishmania. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 5, p. 565–576, 2007.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The Strange Case of Leishmania chagasi. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188–189, 2000.

MCCALL, L. I. et al. Adaptation of leishmania donovani to cutaneous and visceral environments: In vivo selection and proteomic analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 2, p. 1033–1059, 2015.

MCCALL, L. I.; MATLASHEWSKI, G. Involvement of the Leishmania donovani virulence factor A2 in protection against heat and oxidative stress. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 109–115, 2012.

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. 518–30, 2010.

MCCALL, L.-I.; ZHANG, W.-W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003053, 2013.

MCCONVILLE, M. J.; HANDMAN, E. The molecular basis of Leishmania pathogenesis. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1047–1051, 2007.

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

MEDDEB-GARNAOUI, A. et al. Cellular and humoral responses induced by Leishmania histone H2B and its divergent and conserved parts in cutaneous and visceral leishmaniasis patients, respectively. **Vaccine**, v. 28, n. 7, p. 1881–1886, 2010.

MENEZES CABRAL, S. et al. A Leishmania infantum cytosolic trypanothione synthase activates B cells to secrete interleukin-10 and specific immunoglobulin. **Immunology**, v. 123, n. 4, p. 555–565, 2008.

- MINOCHE, A. E.; DOHM, J. C.; HIMMELBAUER, H. Evaluation of genomic high-throughput sequencing data generated on Illumina HiSeq and Genome Analyzer systems. **Genome Biology**, v. 12, n. 11, p. R112, 2011.
- MIRALLES, G. D. et al. Th1 and Th2 Cell-Associated Cytokines in Experimental Visceral Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 1058–1063, 1994.
- MODOLELL, M. et al. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. **European journal of immunology**, v. 25, n. 4, p. 1101–4, 1995.
- MOJTAHEDI, Z.; CLOS, J.; KAMALI-SARVESTANI, E. Leishmania major: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 422–429, 2008.
- MOODY, S. F.; MCCONVILLE, M. J.; BACIC, A. The structure of Leishmania major amastigote lipophosphoglycan. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 25, p. 18457–18466, 1993.
- MOONS, K. G. M. et al. Prognosis and prognostic research: what, why, and how? **BMJ**, v. 338, n. 23 1, p. b375–b375, 2009.
- MOORE, B. et al. Structural basis of molecular recognition of the Leishmania Small Hydrophilic Endoplasmic Reticulum-associated Protein (SHERP) at membrane surfaces. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 9246–9256, 2011.
- MORALES, M. A et al. Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the Leishmania donovani infectious stage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 18, p. 8381–8386, 2010.
- MORENO, J. et al. Immunization with H1, HASPB1 and MML Leishmania proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. **Vaccine**, v. 25, n. 29, p. 5290–5300, 2007.
- MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 375–381, 2004.
- MUELLER, Y. et al. Risk factors for in-hospital mortality of visceral leishmaniasis patients in eastern Uganda. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 8, p. 910–917, 2009.
- MURRAY, A. et al. Regions in the 3' untranslated region confer stage-specific expression to the Leishmania mexicana a600-4 gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 153, n. 2, p. 125–132, 2007.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.
- MYLER, P. J. et al. Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 6, p. 2902–2906, 1999.
- MYLER, P. J. et al. Genomic organization and gene function in Leishmania. **Biochemical**

Society Transactions, v. 28, n. 5, p. 527–531, 2000.

NAGALAKSHMI, U. et al. The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. **Science**, v. 320, n. 5881, p. 1344–1349, 2008.

NAGALAKSHMI, U.; WAERN, K.; SNYDER, M. RNA-Seq: A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis. In: **Current Protocols in Molecular Biology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 1–13.

NASCIMENTO, E. L. T. et al. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2964–2967, 2008.

NETT, I. R. E. et al. The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 8, n. 7, p. 1527–1538, 2009.

NIKNAM, H. M. et al. Immune responses of Iranian patients with visceral leishmaniasis and recovered individuals to LCR1 of *Leishmania infantum*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 4, p. 518–525, 2014.

NILSSON, D. et al. Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, p. 21–22, 2010.

NOWROUSIAN, M. Next-Generation Sequencing Techniques for Eukaryotic Microorganisms: Sequencing-Based Solutions to Biological Problems. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 9, p. 1300–1310, 2010.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 9, p. 378–384, 2007.

O'BRIEN, S. J. The Promise of Comparative Genomics in Mammals. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 458–481, 1999.

OLIVEIRA, J. M. DE et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 188–193, 2010.

OSLEY, M. A. The Regulation of Histone Synthesis in the Cell Cycle. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 827–861, 1991.

OSMAN, O. F.; KAGER, P. A.; OSKAM, L. Leishmaniasis in the Sudan: A literature review with emphasis on clinical aspects. **Tropical Medicine and International Health**, v. 5, n. 8, p. 553–562, 2000.

OUAKAD, M. et al. Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in *Leishmania major* developmental stages. **Parasitology Research**, v. 101, n. 2, p. 473–477, 2007.

OVERATH, P. et al. The surface structure of trypanosomes in relation to their molecular phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 468–471, 2001.

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.

PAPADAKI, A. et al. The *Leishmania donovani* histidine acid ecto-phosphatase *Ld* MACP: insight into its structure and function. **Biochemical Journal**, v. 467, n. 2, p. 473–486, 2015.

PAPADOPOULOU, B. et al. Stage-Specific Regulation of Gene Expression in. v. 69, n. 6, p. 282–288, 2003.

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

PEREIRA, B. A. S.; BRITTO, C.; ALVES, C. R. Expression of infection-related genes in parasites and host during murine experimental infection with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 52, n. 2, p. 101–108, 2012.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in *Leishmaniasis* transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2009.

PIÉTU, G. et al. The genexpress IMAGE knowledge base of the human brain transcriptome: A prototype integrated resource for functional and computational genomics. **Genome Research**, v. 9, n. 2, p. 195–209, 1999.

PIROFSKI, L.; CASADEVALL, A. What is infectiveness and how is it involved in infection and immunity? **BMC Immunology**, v. 16, n. 1, p. 13, 2015.

PISCOPO, T. V.; MALLIA AZZOPARDI, C. *Leishmaniasis*. **Postgraduate Medical Journal**, v. 83, n. 976, p. 649–657, 2007.

PORTMAN, N.; GULL, K. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 2, p. 135–148, 2010.

QUEIROZ M.A, ALVES J. G. B., C. J. B. **Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area**. Disponível em: <<http://www.jped.com.br/conteudo/04-80-02-141/ing.asp>>. Acesso em: 4 abr. 2015.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1915, 2009.

RAFATI, S. et al. *Leishmania major* heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. **Vaccine**, v. 25, n. 21, p. 4159–4169, 2007.

RAGHAVAN, A. Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 24, p. 5529–5538, 2002.

RAMAMOORTHY, R. et al. Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani* chagasi promastigotes to an infectious form. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 1888–1895, 1992.

- RASTROJO, A. et al. The transcriptome of *Leishmania major* in the axenic promastigote stage: transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 223, 2013.
- REINER, N. E. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. **Immunology today**, v. 15, n. 8, p. 374–81, 1994.
- REQUENA, J. M. Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 17, p. 2069–2085, 2011.
- RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Neutrophils Activate Macrophages for Intracellular Killing of *Leishmania major* through Recruitment of TLR4 by Neutrophil Elastase. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 3988–3994, 2007.
- RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1–8, 2012.
- RICO, A. I. et al. The heat shock proteins, Hsp70 and Hsp83, of *Leishmania infantum* are mitogens for mouse B cells. **Cell stress & chaperones**, v. 7, n. 4, p. 339–46, 2002.
- RILEY, R. D. et al. Prognosis Research Strategy (PROGRESS) 2: Prognostic Factor Research. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 2, p. e1001380, 2013.
- RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505–510, 2009.
- ROCHETTE, A. et al. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 140, n. 2, p. 205–220, 2005.
- ROCHETTE, A. et al. Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 32–47, 2009.
- ROGERS, M. E. et al. *Leishmania infantum* proteophosphoglycans regurgitated by the bite of its natural sand fly vector, *Lutzomyia longipalpis*, promote parasite establishment in mouse skin and skin-distant tissues. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 11, p. 875–879, 2010.
- ROGERS, M. E. The Role of *Leishmania* Proteophosphoglycans in Sand Fly Transmission and Infection of the Mammalian Host. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–13, 2012.
- ROJAS-BERNABÉ, A et al. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. **Parasitology**, v. 141, n. 6, p. 788–800, 2014.
- ROMAO, S. et al. The cytosolic trypanothione of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 6, p. 703–711, 2009.
- ROSENZWEIG, D. et al. Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. **Proteomics**, v. 8, n. 9, p. 1843–1850, 2008.

- ROUSSEAU, D. et al. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17, 2001.
- SÁDLOVÁ, J. et al. The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 1765–1779, 2010.
- SALOTRA, P. et al. Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-azar dermal leishmaniasis. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 3, p. 637–644, 2006.
- SANTOS, M. A. et al. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 629–633, 2002.
- SANTRICH, C. et al. A motility function for the paraflagellar rod of *Leishmania* parasites revealed by PFR-2 gene knockouts. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 95–109, 1997.
- SARKAR, A. et al. Strains Causing Self-Healing Cutaneous Leishmaniasis Have Greater Susceptibility Towards Oxidative Stress. **Free Radical Research**, v. 46, n. 5, p. 665–673, 2012.
- SAXENA, A. et al. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, n. 1, p. 53–65, 2007.
- SCHENA, M. et al. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 467–470, 1995.
- SCHROEDER, J.; AEBISCHER, T. Vaccines for Leishmaniasis: From proteome to vaccine candidates. **Human Vaccines**, v. 7, n. sup1, p. 10–15, 2011.
- SHARMA, P. et al. Comparative in vivo expression of amastigote up regulated *Leishmania* genes in three different forms of Leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 59, n. 2, p. 262–264, 2010.
- SIEGEL, T. N. et al. Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 15, p. 4946–4957, 2010.
- SIEGEL, T. N. et al. Gene expression in *Trypanosoma brucei*: lessons from high-throughput RNA sequencing. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 434–441, 2011.
- SILVA, A. R. DA et al. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 358–364, 2008.
- SILVA, J. P. DA et al. Factors associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 480–484, 2012.

SILVA, J. M. et al. Bone marrow parasite burden among patients with new world kala-azar is associated with disease severity. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 621–626, 2014.

SILVA-ALMEIDA, M. et al. Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 387, 2014.

SILVERMAN, J. M. 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. 6, p. 842–852, 2010.

SINGH, B.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, v. 30, n. 26, p. 3834–3842, 2012.

SINGH, R. et al. Overexpression of histone H2A modulates drug susceptibility in *Leishmania* parasites. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 1, p. 50–57, 2010.

SINHA, S.; KUMAR, A.; SUNDARAM, S. A comprehensive analysis of LACK (*Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase) in the context of Visceral Leishmaniasis. **Bioinformatics**, v. 9, n. 16, p. 832–7, 2013.

SKEIKY, Y. A et al. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. **Journal of immunology**, v. 161, p. 6171–6179, 1998.

SKEIKY, Y. A. W. et al. A Recombinant *Leishmania* Antigen that Stimulates Human Peripheral Blood Mononuclear Cells to Express a Th1-Type Cytokine Profile and to Produce Interleukin 12. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, p. 1527–1537, 1995.

SMITH, D. F.; PEACOCK, C. S.; CRUZ, A. K. Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniases. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 11, p. 1173–1186, 2007.

SOMANNA, A.; MUNDODI, V.; GEDAMU, L. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex: Evidence for the activation of latent transforming growth factor β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25305–25312, 2002.

SOTO, M. et al. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 48, n. 3, p. 209–214, 1995.

SOTO, M. et al. Histone synthesis in *Leishmania infantum* is tightly linked to DNA replication by a translational control. **Biochemical Journal**, v. 346, n. 1, p. 99, 2000.

SOTO, M. et al. Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosynthesis in *Leishmania infantum*. **Biochemical Journal**, v. 379, n. 3, p. 617–625, 2004.

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.

STEBECK, C. E. et al. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially

expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 71, n. 1, p. 1–13, 1995.

STIERHOF, Y.-D. et al. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. **European Journal of Cell Biology**, v. 78, n. 10, p. 675–689, 1999.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.

SUNDAR, S. et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: An open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9764, p. 477–486, 2011.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony Toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 2010.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 5, p. 951–958, 2002.

TACCHINI-COTTIER, F. et al. An Immunomodulatory Function for Neutrophils During the Induction of a CD4⁺ Th2 Response in BALB/c Mice Infected with *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 5, p. 2628–2636, 2000.

TEIXEIRA, S. M. R. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 12, p. 1503–1516, 1998.

TEIXEIRA, S. M. R.; DA ROCHA, W. D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 2, n. 1, p. 148–158, 2003.

UENO, N. et al. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum* chagasi promastigotes. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 1827–1841, 2009.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 2004.

VEITCH, N. J. et al. Digital gene expression analysis of two life cycle stages of the human-infective parasite, *Trypanosoma brucei gambiense* reveals differentially expressed clusters of co-regulated genes. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 124, 2010.

VERDUN, R. E. et al. Gene discovery through expressed sequence Tag sequencing in *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 66, n. 11, p. 5393–5398, 1998.

VERESS, B. et al. Morphology of the spleen and lymph nodes in fatal visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 33, p. 605–610, 1977.

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, p.

e10107, 2010.

VINET, A. F.; FUKUDA, M.; DESCOTEAUX, A. The Exocytosis Regulator Synaptotagmin V Controls Phagocytosis in Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 8, p. 5289–5295, 2008.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.

WEBB, J. R. et al. Molecular characterization of the heat-inducible LmSTI1 protein of *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 179–193, 1997.

WEBB, J. R. et al. Human and Murine Immune Responses to a Novel *Leishmania major* Recombinant Protein Encoded by Members of a Multicopy Gene Family. **Infect Immun**, v. 66, n. 7, p. 3279–3289, 1998.

WERNECK, G. L. et al. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection**, v. 31, n. 3, p. 174–177, 2003.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2937–2940, 2008.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644–645, 2010.

WILHELM, B. T. et al. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. **Nature**, v. 453, n. 7199, p. 1239–1243, 2008.

WILSON, M. E. et al. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 2062–2069, 1995.

WINCKER, P. et al. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 9, p. 1688–1694, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control OF Leishmaniasis. GENEVA. **World Health Organization technical report series**, p. 185, 2010.

WORTHEY, E. A. et al. *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 14, p. 4201–4210, 2003.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, v. 336, n. 1, p. 1–17, 1998.

WU, Y. et al. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 110, n. 2, p. 345–357, 2000.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of

Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1–16, 2003.

ZACKAY, A. et al. Polymorphism in the HASPB Repeat Region of East African Leishmania donovani Strains. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p. e2031, 2013.

ZANIN, F. H. C. et al. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against Leishmania chagasi and Leishmania amazonensis experimental infections. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 9, p. 1070–1077, 2007.

ZEMANOVÁ, E. et al. The Leishmania donovani complex: Genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 2, p. 149–160, 2007.

ZHANG, W. W. et al. Genetic Analysis of Leishmania donovani Tropism Using a Naturally Attenuated Cutaneous Strain. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 7, p. e1004244, 2014.

ZHANG, W.-W.; MATLASHEWSKI, G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in Leishmania donovani: involvement of A2 in visceralization during infection. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 935–948, 2001.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The Role of pH and Temperature in the Development of Leishmania Parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 449–470, 1994.

5. Artigos originados da tese

5.1 Valéria C. S. Oliveira, Vladimir C. Silva e Carlos Henrique N. Costa. Leishmaniose visceral e fatores de virulência: Uma atualização/Visceral leishmaniasis and virulence factors: an update. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. EJCM-D-16-00301.

5.2 Valéria C. S. Oliveira, Vladimir C. Silva, Valdir de Queiroz Balbino, Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior, Raul Maia Falcão e Carlos Henrique N. Costa. Avaliação do perfil de expressão gênica de promastigotas em cultura axênica de cepas de *L. infantum* de pacientes com doença grave e não grave/Assessment of the genic expression profile of promastigotes in axenic culture of *L. infantum* strains from patients with severe and non-severe disease. **BMC Genomics**. GICS-D-16-00714.

Confirmation of your submission to BMC Genomics - GICS-D-16-00714

BMC Genomics Editorial Office

GICS-D-16-00714

Assessment of the genic expression profile of promastigotes in axenic culture of *L. infantum* strains from patients with severe and non-severe disease

Valéria Simeão Oliveira, Vladimir Costa Silva, PhD; Valdir de Queiroz Balbino, PhD; Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior, PhD; Raul Maia Falcão; Carlos Henrique Nery Costa, PhD

BMC Genomics

Dear

Mrs Oliveira, Thank you for submitting your manuscript 'Assessment of the genic expression profile of promastigotes in axenic culture of *L. infantum* strains from patients with severe and non-severe disease' to BMC Genomics.

The submission id is: GICS-D-16-00714. Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following: website: <http://gics.edmgr.com/>

If you have forgotten your username or password please use the "Send Login Details" link to get your login information. For security reasons, your password will be reset.

Best wishes,

Editorial Office BMC Genomics

<http://www.biomedcentral.com/bmcgenomics>

5.1 Leishmaniose visceral e fatores de virulência: Uma atualização.

Visceral leishmaniasis and virulence factors: an update.

Valéria C. S. Oliveira, Vladimir C. Silva e Carlos Henrique N. Costa

Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses, Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella,
Teresina, Brasil.

Autor correspondente: Costa, C.H.N. (chncosta@gmail.com)

Resumo

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários parasitas que afetam tanto animais quanto os seres humanos e predomina em várias partes do mundo. É classificada em três grandes entidades clínicas: a cutânea, mucocutânea e a visceral, esta última, a mais grave, torna-se fatal se não tratada. Vários fatores de virulência são produzidos por estes parasitas para permitir a sua sobrevivência e estabelecimento da infecção. Nesta revisão nós caracterizamos os fatores de virulência utilizados pelas *Leishmanias* para subverter a resposta imune do hospedeiro, além de, discutirmos as possíveis estratégias para o desenvolvimento de novos componentes candidatos, para a terapia das leishmanioses.

Abstract

Leishmaniasis is a disease caused by parasite protozoa that affects both animals and humans and that prevails in several parts of the world. It is classified into three major clinical entities: cutaneous, mucocutaneous and visceral; the latter is the most dangerous type and becomes lethal if not treated. Several virulence factors are produced by these parasites to allow their survival and the onset of infection. In this review, we have characterized the virulence factors used by the *Leishmania* to subvert the host's immune response. We also discuss the possible strategies for the development of new potential components for the leishmaniasis therapy.

Introdução

O gênero *Leishmania* é composto por protozoários parasitas responsáveis pelas leishmanioses, um grupo de doenças que afeta tanto animais quanto os seres humanos e predomina em várias partes do mundo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais [1]. É endêmica em 98 países com mais de 350 milhões de pessoas em risco, com uma incidência estimada de 2 milhões de novos casos por ano e 0,5 milhões de casos por LV [2]. A leishmaniose é classificada em três grandes entidades clínicas: a cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e a visceral (LV) [3], esta última torna-se mais grave, principalmente se não tratada, podendo ser fatal [4]. As espécies responsáveis pela LV são: *L. donovani* e *L. infantum/chagasi*, e raramente, o fenótipo da doença também pode ser manifestado pela *L. tropica* e *L. amazonensis* [5]. O ciclo de vida destes parasitas é dimórfico, onde residem nos vetores flebotomíneos como promastigotas extracelulares, forma na qual é transmitida para os seus hospedeiros definitivos (mamíferos), e lá permanecem como a forma amastigota intracelular no interior dos macrófagos [3].

Nesta revisão nós definimos a patogênese da *Leishmania* no âmbito da interação parasita-hospedeiro (IPH) bem como caracterizamos de forma atualizada os fatores de virulência (FV) utilizados pelas *Leishmanias* para subverter a resposta imune do hospedeiro. Além disso, discutimos as possíveis estratégias para o desenvolvimento de novos componentes candidatos, a partir destes FV, para a terapia das leishmanioses.

A patogênese da *Leishmania* segundo o quadro dano-resposta

A LV imunologicamente é caracterizada por uma resposta Th1 que se correlaciona com a resistência e uma resposta Th2 associada à susceptibilidade à infecção [6]. A IPH inicia uma série de eventos, que envolvem o sistema imune inato com recrutamento de células inflamatórias bem como propicia a indução da imunidade adaptativa envolvendo receptores de reconhecimento em diferentes células, incluindo macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK (Natural Killer) [7], conduzindo a produção de citocinas e à ativação de vias de sinalização intracelular, necessárias para a iniciação de respostas inflamatórias e do controle da proliferação dos parasitas [8].

De acordo com Casadevall et al. (1999), as IPH deflagram a patogênese da doença, e tanto o parasita quanto o hospedeiro contribui para o desenvolvimento da mesma, que pode gerar danos ao hospedeiro ou não, dependendo da sua resposta imunológica [9]. Neste contexto, é possível analisar a patogênese da leishmaniose sob o ponto de vista do quadro

dano-resposta no qual se avalia os danos no hospedeiro como uma função da resposta imune no próprio hospedeiro e cujos danos variam de acordo com a magnitude da resposta imune [9–11].

A resposta imune fraca é insuficiente para trazer benefícios ao hospedeiro e os danos são gerados principalmente pelo patógeno. Já, respostas imunes fortes são excessivamente inapropriadas e também geram danos ao hospedeiro [10, 12]. E qualquer resposta que evita ou minimiza danos no hospedeiro é considerada adequada [9]. Badaró et. al. (1986), demonstraram que a proporção da LV subclínica em relação à sintomática é estimada em até 18:1 [4]. Assim, muitas pessoas infectadas com espécies causadoras de LV desenvolvem uma resposta imune eficaz e a doença clínica não se manifesta [5]. No entanto, uma resposta imune fraca, promovida por uma imunossupressão induzida pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias (Th-1/IL-12) e contrabalanceada pelas regulatórias (Th-2/IL-10), favorece o estabelecimento da infecção, provavelmente através dos mecanismos de defesa do parasita, fatores de virulência (FV), bem como a visceralização e o crescimento da *Leishmania* [5]. O hospedeiro torna-se sintomático e manifesta neste quadro (Fig.1), o desenvolvimento de febre, hepatoesplenomegalia, perda de peso e anemia, ou seja, os sinais clássicos da LV [13–15].

Por outro lado, uma vez que estes parasitas não produzem toxinas e não destroem as células do parênquima [16], um quadro de resposta imune celular excessiva, mediado pela liberação de várias citocinas como, interleucinas 6 e 8 (IL-6, IL-8), interferon- γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral (TNF) foi associado com a inflamação sistêmica prejudicial, permitindo tanto a proliferação da *Leishmania*, quanto o desenvolvimento dos sintomas, gerados pelos danos causados pela resposta imune exagerada (RIE), tais como, as manifestações hemorrágicas, icterícia, sepse, edema e insuficiência renal (glomerulonefrites) caracterizando a leishmaniose visceral grave com progressão letal [15–17]. Recentemente, foi demonstrado por Silva, et al. (2014), que estes sintomas que resultam da RIE não foram fortemente associados com a carga parasitária (CP), contrariando a ideia de que o aumento da proliferação do parasita conduz à gravidade e morte, porém, a desnutrição foi um fator que correlacionou-se fortemente com a CP elevada, provavelmente pela imunossupressão que permitiu o crescimento do parasita levando ao excesso de citocinas inflamatórias que podem desencadear a inflamação sistêmica e morte, como observado em seus resultados [17].

A virulência do parasita *Leishmania*

Além da resposta imune montada que define a patogênese em termos de danos ao hospedeiro, outro aspecto importante e que também afeta a IPH é a virulência, uma propriedade do patógeno, mas modulada pela susceptibilidade e resistência do hospedeiro [9, 18]. Vários componentes microbianos são determinantes para o desenvolvimento da virulência por facilitar a entrada e a evasão das defesas do hospedeiro bem como favorecer a replicação, neutralização das respostas imunes e a capacidade de adquirir nutrientes e sentir as mudanças do meio ambiente [9, 11].

Na *Leishmania*, durante a diferenciação de promastigota para amastigota, o parasita sofre alternância de hospedeiro e é sujeito a mudanças rápidas em função do novo ambiente, [19]. Assim, as alterações morfológicas e fisiológicas que estes parasitas sofrem são o resultado da regulação diferencial de uma variedade de genes e proteínas que são expressos e dão a estes organismos a capacidade de resistir e sobreviver a essas novas condições [20]. Nesta IPH, os múltiplos FV produzidos (Tabela 1), podem intensificar o grau de dano ao hospedeiro em função do grau da resposta imune induzida [21], embora até hoje, nenhum FV que possa desencadear a doença grave da LV, foi identificado até o momento.

Fatores de virulência em promastigotas e/ou amastigotas ancorados no glicosilfosfatidilinositol (GPIs)

Lipofosfoglicano (LPG) É a principal macromolécula do glicocálix da superfície de promastigotas [22]. Diferenças na composição dos açúcares destas moléculas, tem sido relacionadas a variabilidade intra e inter-espécies com implicações na antigenicidade destes parasitas [23, 24]. As *Leishmanias*, para sobreviverem intracelularmente, utilizam estratégias que desativam funcionalmente os macrófagos das células hospedeiras, geralmente, manipulando vias de transduções de sinais [25].

Recentemente, em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) humanas infectadas com *L. mexicana*, foi demonstrado que o LPG pode induzir a produção de citocinas pelos receptores TLR2 e TLR4 (Toll-like) dos macrófagos, mediados pelas vias, quinase extracelular regulada por sinal (ERK) e proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK) [26]. Na *L. major*, em estudos in vitro com PBMCs humanas, a sinalização ativada pelo LPG, resultou em produção elevada de citocinas e espécies reativas do oxigênio (ROS) [27].

Fosfolipídios de glicosilinositol (GIPLs) A superfície de promastigotas e amastigotas de *Leishmania* é também revestida com uma classe de pequenos fosfolipídios de glicosilinositol (GIPLs) [28]. Em *L. donovani*, bem como *L. infantum* e *L. brasiliensis* foi verificado através de estudos in vitro em macrófagos murinos, que os GIPLs ajudam na sobrevivência dentro do macrófago por inibir a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na produção de NO, que é tóxico para esses parasitas, além da via de sinalização dependente da Proteína quinase C (PKC) [29, 30].

Proteofosfoglicanos (PPGs) São polipeptídeos altamente glicosilados com potenciais para virulência e que podem ser encontrados em várias formas; a filamentosa (fPPGs), a secretada (sPPGs) e à forma ligada a componentes de membrana (mPPGs). Estas diferentes formas dos PPGs desempenham papéis importantes no estabelecimento da infecção pela *Leishmania* [31, 32]. Foi demonstrado, que o fPPG secretado pelo parasita é inoculado junto com a saliva do inseto vetor (*L. longipalpes*), na pele do hospedeiro facilitando a infecção e a visceralização do parasita em modelos murinos in vivo [33]. Já os sPPGs, parecem ser um potente indutor de ROS e IL-10, e em menor grau de IFN- γ e IL-12, nas PBMCs humanas em trabalhos in vitro [34].

KMP-11 É um complexo protéico, assim chamado, devido à presença de uma proteína de 11 kDa (kiloDalton) na membrana de todos os protozoários cinetoplastídeos [35]. Em macrófagos murinos infectados (in vitro) com *L. amazonensis*, o aumento da CP é o resultado da estimulação da produção de IL-10, e da atividade da arginase que inibi a síntese de NO, induzidos pela KMP-11, favorecendo a replicação do parasita [36].

A antigenicidade destas proteínas também foram demonstradas em modelos caninos infectados com *L. infantum* (in vivo), e em PBMCs humanas infectadas com *L. donovani* (in vitro) em que promoveu um aumento do nível de expressão dos mRNAs de IFN- γ , induzindo respostas imunes Th1 [37]. Além disso, a ativação da via do fator de transcrição nuclear (NF κ - β), através das células dendríticas (CD), induzindo a produção de IL-10 e do fator transformador de crescimento beta (TGF- β) em macrófagos, podem alterar o resultado da doença [38].

Antígeno de superfície de promastigota (PSA), também conhecido como (gp46), representa uma glicoproteína de superfície abundante que está presente em duas formas: solúvel e ancorada à membrana [39]. Em *L. chagasi* (= *L. infantum*), este antígeno é capaz de induzir in vitro, a resistência a lise mediada pelo sistema complemento humano [40]. Também

foi sugerido, que esta proteína, favoreceu a proliferação celular (in vitro) da *L. donovani*, da superfície da pele dos pacientes com PKDL (Leishmaniose dérmica pós calazar) [41].

Enzimas associadas a fatores de virulência em promastigotas e/ou amastigotas.

Leishmanolisina ou gp63 É uma metaloproteinase de 63 kDa, presente na superfície das *Leishmanias* [42], que atua sobre uma ampla gama de substratos das células hospedeiras alterando a maquinaria de vias de sinalização celular como, a inibição da p38 MAPK [43]. Recentemente foi identificado na *Leishmania*, um sistema de secreção baseado nos exossomos [44] onde a gp63 secretada por este sistema na *L. major*, é crucial para a diminuição da resposta inflamatória inata in vitro, durante o início da infecção pelo parasita em macrófagos murinos [45].

Também foram identificados, um grande grupo de proteínas de membranas, denominadas de sinaptotagminas (Syt) [46], em macrófagos murinos, como a Syt XI, que promove a regulação da secreção de citocinas (TNF e IL-6), a captação de partículas na fagocitose e a atividade microbicida dos macrófagos [47]. A gp63 de promastigotas de *Leishmania major* e *donovani* degradam a Syt XI dos vacúolos parasitóforos de macrófagos murinos, in vitro, favorecendo um aumento da secreção de TNF e IL-6 além do recrutamento de fagócitos para o local da infecção, contribuindo para o estabelecimento da doença [48].

Cisteínas-proteases (CisPs) São enzimas que exibem papéis críticos na patogênese de várias infecções por parasitas protozoários. A maioria das CisPs de *Leishmanias*, foram denominadas de: CPA e CPB (Catepsinas tipo L) e CPC (Catepsinas tipo B) [49]. Recentemente, foi verificada uma grande diversidade de genes de proteases entre as espécies de *Leishmanias*, um aspecto que pode estar relacionado com suas adaptações à cada microambiente habitado por estes parasitas, [50]. Variações no padrão de expressão de genes das CisPs em hospedeiros murinos com distintos níveis de susceptibilidade à infecção por *L. mazonensis*, foram observados e os genes CPBs expressaram mais do que os CPCs, independente da linhagem do hospedeiro [51].

Em *L. infantum*, foi demonstrado in vitro, que a CPA está relacionada com a habilidade em infectar as células do hospedeiro mamífero [52], e a CPC, além de auxiliar na IPH, também colabora com a sobrevivência dentro dos macrófagos humanos, através da ativação do TGF- β latente [53]. Mais recentemente, investigaram o papel das CPCs, em CD e macrófagos murinos infectados in vitro por *L. major*, avaliando o controle dos mediadores da resposta Th1 durante a infecção e a proliferação dos parasitas. Os dados mostram que a CPC

induziu uma maior expressão de citocinas IL-12 liberadas pela resposta Th1, sugerindo que esta protease tenha um papel regulador sobre esta resposta em função da sua sub-regulação [54].

Fosfatase ácida (AcP) As proteínas AcPs que apresentaram localização extracelular do seu domínio catalítico, pertencem a uma nova família de ecto-fosfatases e foram identificadas na superfície celular de promastigotas de *L. major* [55] e *L. amazonensis* [56]. Recentemente, uma AcP de membrana da *L. donovani* (LdMAcP), foi caracterizada como polimórfica e divergente na especificidade dentro do complexo da *L. donovani*, sugerindo diferenças na localização e/ou na atividade enzimática. Além disso, é possível que esta proteína, manipule um sistema de reconhecimento de sinal em macrófagos murinos, a fim de obter acesso para sobreviver no meio intracelular [57].

Sistemas Tripanotona/Tripanotona redutase (TR/T(SH)₂) e Triparedoxina/Triparedoxina peroxidase (TXN/TXNP_x) O sistema TR/T(SH)₂, é um complexo multienzimático central nos sistemas de defesa redox dos *Tripanossomatídeos* [58]. Em *L. infantum*, foram identificados dois genes que codificavam, uma TXN localizada no citosol (*LiTXN1*) e outra na mitocôndria (*LiTXN2*), esta última, parece participar de uma via para a desintoxicação do hidroperóxido em mitocôndrias, semelhante ao da proteína citosólica [59].

Em *L. donovani* transfectada com uma cTXNP_x mais resistente ao H₂O₂ e NO, foi demonstrado in vitro um aumento de expressão da proteína e da virulência, gerando elevada CP nos macrófagos murinos [60]. A importância desta enzima, também foi verificada, ao longo do ciclo de vida da *L. infantum* [61], bem como o seu papel, nas funções efectoras das células B, conduzindo à secreção de IL-10 e a produção de anticorpos específicos potencializando a progressão da doença [62].

Outras proteínas e antígenos como fatores de virulência em promastigotas e/ou amastigotas

Proteínas de choque térmico (HSP) São proteínas que exibem funções de chaperonas auxiliando nos dobramentos protéicos, montagens de proteínas complexas e nas translocações de proteínas através dos compartimentos celulares [63, 64]. Na *L. donovani* a HSP70 tem sido caracterizada como um antígeno dominante alvo da resposta imune humoral nas infecções [65]. Em *L. infantum*, também foi demonstrado que as proteínas HSP70 e HSP83 se comportam como potentes mitógenos in vitro para as células B dos esplenócitos murinos [66]. Recentemente, foi avaliado in vitro a eficácia protetora destas proteínas em

murinos infectados com *L. donovani*, mostrando uma forte resposta protetora contra a LV, verificada pela CP reduzida e aumento dos níveis de IgG2a, IFN- γ e IL-2 [67].

Histonas São proteínas conservadas que se associam com o DNA para formar o nucleossoma em eucariotos. Na *L. infantum*, as histonas nucleares induziram uma resposta humoral in vitro com o soro de cães com LV (LVC) [68]. E foi demonstrado, que a histona H2B da *L. major*, apresenta tanto a capacidade de induzir a proliferação de altos níveis de PBMCs humanas, in vitro, quanto IFN- γ em indivíduos com LC, além de promover uma resposta Th1 com menor nível de IL-10 [69]. Na *L. donovani* proveniente de pacientes com LV resistente aos antimônios a avaliação da expressão de genes, identificaram elevada expressão de genes que codificam várias histonas (H1, H2A, H4) e MAPK1 [70].

Proteína A2 Foi identificada pela primeira vez em amastigotas de *L. donovani* [71]. E a sua expressão foi demonstrada em *L. major*, caracterizando o seu papel na sobrevivência e na visceralização do parasita [72]. McCall et al. (2010), indentificaram uma chaperona ligada ao retículo endoplasmático (BiP) que colocaliza-se e liga-se com a proteína A2, seguinte ao estresse pelo choque térmico. Este mecanismo parece ser importante na proteção da *L. donovani* ao stress associado pela infecção em órgãos viscerais, incluindo a febre [73] e estresse oxidativo [74, 75].

Diferenças no nível de expressão do mRNA da proteína A2 em pacientes com LV e PKDL por *L. donovani* e pacientes com LC por *L. tropica* mostraram níveis mais elevados de expressão na LV e mais baixo na PKDL e LC [76]. Apesar da LV e PKDL serem provenientes do mesma espécie, foi recentemente sugerido que polimorfismos (SNPs) e/ou variações no número de cópias de genes da mesma espécie (*L. donovani*), pode estar relacionado com esses fenômenos, responsáveis pela diferença no tropismo e na patologia alterada [77]. Esses fenômenos, também já tinham sido observados por Rogers et al. (2012), onde a amplificação do cromossomo pode alterar a expressão dos genes em resposta às condições ambientais do hospedeiro, fornecendo uma base genética para a o tropismo da doença [78].

Recentemente, foi demonstrado através de análise proteômica, que cepas de *L. donovani* que causavam síndromes clínicas diferentes, não apresentavam grandes mudanças nos perfis proteômicos, mas diferiram em vias de síntese, proteção e sinalização em relação às vias de transporte e tráfico. Sugerindo que a *L. donovani* é adaptável e pode remodelar seu proteoma para sobreviver em diferentes ambientes no seu hospedeiro [79]. Todas estas observações mostram que a proteína A2 desempenha um papel importante na sobrevivência

destes parasitas, e a avaliação da imunização com proteína recombinante A2 mostrou significativa proteção contra a infecção, além de proteção parcial contra espécies de *Leishmania*, induzindo uma resposta imune Th1, o que a capacita para ser alvo potencial de vacina [80, 81].

Amastina É uma proteína de superfície abundante que foi identificada em amastigota de *Leishmania*, e compartilha homologia com as amastinas do *T. cruzi* [82]. A análise de expressão em *L. major* e *L. infantum* demonstraram que algumas amastinas são estágio-específica do seu ciclo de vida, e que os perfis de expressão dos vários ortólogos são diferentes entre estas duas espécies [83].

Em um recente trabalho com *L. braziliensis*, foi demonstrado que as amastinas α , β , γ e δ são localizadas na superfície do parasita e que a não expressão da δ -amastina, resulta em diminuição da sobrevivência e proliferação dos parasitas intracelulares tanto após a infecção *in vitro* de macrófagos murinos quanto a infecção *in vivo* dos camundongos. Além disso, alterações significativas entre as interações de membranas dos macrófagos e das amastigotas intracelulares, sugerem que as amastinas são FV essenciais para a replicação do parasita no interior da célula hospedeira do mamífero [84].

Proteína de superfície acilada e hidrófila (HASP) Também classificada como HASPA e HASPB em *Leishmania*, são estágio reguladas e expressas na membrana plasmática do parasita apenas nas fases infecciosas (metacíclica e amastigota) [85]. Estas proteínas apresentam domínios centrais repetitivos altamente variáveis nas suas sequências de aminoácidos, dentro e entre espécies, o que as capacitam na antigenicidade ao cão e ao homem, consistente com o papel no reconhecimento imune do hospedeiro [86, 87]. Recentemente, identificaram polimorfismos na região repetida k26 da HASPB, mostrando variabilidade entre os isolados de *L. donovani* de diferentes origens [88].

Outra proteína metacíclica é a SHERP (proteína hidrofílica associada ao retículo endoplasmático), cujo gene é encontrado dentro da família de genes *LmcDNA16* da *L. major* [89]. Além disso, juntamente com a HASPB, desempenham um papel vital no processo de diferenciação e/ou no parasita metacíclico da *L. major* [89–91].

Haste/Rod paraflagelar (PFR) Estas proteínas são um dos vários atributos únicos que caracterizam a biologia dos protozoários cinetoplastídeos. Os primeiros estudos identificaram duas proteínas abundantes, a PFR-1 e PFR-2 [92]. O papel funcional da PFR foi demonstrado em mutantes nocauteados de *L. mexicana* onde causou uma grande redução na

velocidade da motilidade destes parasitas [93]. Estas proteínas foram diferencialmente expressadas em promastigotas pró-cíclicas e metacíclicas de *L. major*, correspondente com as etapas infecciosas onde se observa maior necessidade de motilidade [94].

Análogo do receptor da proteína quinase C (LACK) Na *Leishmania*, o antígeno LACK é um análogo do receptor da proteína quinase C ativada em mamíferos (RACK), e muito conservado entre espécies de *Leishmania* [95]. A sua expressão ocorre em ambas as formas do parasita [96] e as sequências dos genes LACK em espécies que causam a LV, apresentam alta conservação com pouca variabilidade e maior antigenicidade [97]. Esta antigenicidade foi demonstrada a partir de diferentes epítomos da proteína LACK provenientes da *L. major*, que estimularam o aumento dos níveis de mRNA de IL-4 pelas células T CD4+ [98].

Em *L. infantum*, a LACK foi localizada próxima ao cinetoplasto e interage com sequências de proteínas que estão envolvidas em uma variedade de funções, desde replicação do DNA, síntese do RNA, processamento de sinais de transdução à regulação do ciclo celular [95]. E recentemente, verificaram que a LACK da *L. mexicana*, pode ligar e aumentar a ativação do plasminogênio promovendo a formação de plasmina. Sugerindo uma nova função que pode contribuir para a capacidade de invasão do parasita [99].

Antígenos *L. major* stresse induzível 1 (LmSTI1) e Antioxidante tiol específico (TSA) O antígeno LmSTI1 foi identificado em isolados da *L. major* e codificado por um gene de cópia única altamente conservado em todo o gênero *Leishmania*. Além de ser constitutivamente expressado tanto em promastigotas quanto amastigotas, esta proteína pode ser regulada positivamente em promastigotas por mudança na temperatura [100].

O TSA, outro antígeno também identificado na *L. major*, foi sugerido como candidato a vacina devido à sua capacidade para induzir uma resposta Th1 em camundongos infectados por este parasita. Esta proteína, é conhecida por ser antigênica em ambos os sistemas murinos e humanos [101]. Além disso, tanto a LmSTI1 quanto o TSA têm sido testados em várias experiências de imunização, fornecendo resultados bastante variáveis. Campos-Neto et al. (2002), verificaram que estes antígenos juntos ou individualmente, induzem a proteção igualmente em murinos susceptíveis a *L. major* induzindo respostas específicas CD4+/Th1 quando juntos e CD8+ apenas com TSA [102]. Em modelos caninos infectados com *L. chagasi*, após imunização com os antígenos TSA, LeIF e LmSTI1 os resultados apontaram uma resposta quase que exclusivamente Th1 [103].

Fator de iniciação eucariótico (LeIF) É uma proteína de *Leishmania* homóloga ao fator de iniciação eucariótico eIF4A [104] e foi descrita originalmente como um adjuvante natural, do tipo Th1 e como um antígeno que induz resposta Th1 mediada por IL-12 nas PBMCs de pacientes com leishmaniose [105–107]. Em *L. donovani*, o fator de alongamento 2 (LeIF-2) foi identificado como uma das proteínas imunoestimuladoras potentes. E o seu recombinante, rLeIF-2 foi capaz de estimular a produção *in vitro* de citocinas do tipo Th1 (IL-12 e IFN γ) em PBMCs de indivíduos normais e curados de LV, bem como, forneceu uma proteção considerável em hamsters infectados [108].

Barhoumi et al. (2011), também demonstraram a antigenicidade dos fragmentos desta proteína eIF4A homóloga da *L. infantum* em PBMCs humanas, onde os níveis de citocinas associados a Th1 pelos monócitos humanos foram elevados [109]. Recentemente, em macrófagos murinos tratados com recombinantes LieIF (fator de iniciação eucariótico em *L. infantum*)/IFN γ , foi observado uma inibição no crescimento intracelular do parasita através de mecanismos que envolvem NO e ROS mediado por TNF- α e MIP-1 α (Proteína inflamatória de macrófago 1 α) [110].

Antígenos Lcr1 e Ldp23 O Lcr1 é um antígeno de amastigota de *L. chagasi* que estimula *in vitro*, células T de esplenócitos murinos a secretar citocinas do tipo Th1/IFN γ , mas não do tipo Th2, isto sugere que o Lcr1 tem o potencial de influenciar a resposta imune do hospedeiro [111]. Recentemente, um estudo comparativo entre as sequências do gene, Lcr1, a partir de isolados de *L. infantum* de regiões geográficas diferentes, mostraram alta identidade, sugerindo um possível uso clínico em potencial para o diagnóstico da leishmaniose por meio de detecção de anticorpos [112, 113]. Outro antígeno interessante é o Ldp23, uma proteína presente na superfície de promastigota de *L. donovani* que é conhecida por acelerar *in vitro* a produção de IFN γ , enquanto inibe a produção de IL-4 em macrófagos murinos [114].

Diagnóstico e tratamento da LV. Novas perspectivas?

O diagnóstico da LV é complexo, pois suas características clínicas assemelham-se com outras doenças, como a malária e febres entéricas [115]. Atualmente, o padrão ouro para o diagnóstico baseia-se na visualização da forma amastigota do parasita em macrófagos através do exame microscópico de aspirados de tecidos (baço, medula óssea ou nódulos linfáticos) [116]. No Brasil, o teste parasitológico de aspirado de medula óssea é o mais recomendado, seguido pelo isolamento do parasita em meio de cultura (*in vitro*) [117].

Em relação ao tratamento da LV, os antimoniais pentavalentes, ainda continuam sendo o tratamento de primeira linha, apesar dos efeitos adversos [118]. E em algumas regiões endêmicas, por exemplo, em Bihar na Índia, devido ao desenvolvimento de resistência aos antimônios, a anfotericina B, têm sido a primeira escolha [119]. Além disso, outras drogas estão em uso como a miltefosina [120] e paromomicina [121].

O desenvolvimento de uma vacina contra a leishmaniose, tem sido uma prioridade por muitos anos [122]. Várias formulações de vacinas, incluindo parasitas mortos, vivos atenuados, proteínas recombinantes de *Leishmania* ou DNA codificador de proteínas, bem como moduladores imunológicos da saliva do flebótomo já foram examinados [123]. Atualmente, com a disponibilidade da seqüência completa do genoma de várias espécies de *Leishmania*, perspectivas promissoras para o estudo de novas moléculas como candidatas a vacinas, tais como, os vários exemplos de FV, aqui descritos [124].

Entre eles, a proteína A2, vem se destacando com resultados promissores para o desenvolvimento de uma vacina para a LV humana [125]. A imunogenicidade e imunidade protetora contra a infecção por *L. chagasi* com uma formulação contendo a proteína recombinante rA2, foi avaliada em cães vacinados. Os resultados mostraram um aumento significativo dos níveis de anticorpos (IgG total e IgG2) e IFN- γ além de baixo nível de IL-10 com limitação na replicação do parasita e prevenção da doença grave [126]. Alves et al. (2009), avaliando linfonodos de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* observaram que a CP em cães sintomáticos foi 73 vezes maior, além, da elevada expressão de IL-10 e TGF- β sugerindo que estas citocinas são importantes na progressão da doença. Já nos cães assintomáticos, verificaram níveis de expressão de IFN γ e TNF- α elevados e CP mais baixa, indicando que estas citocinas desempenham um papel na proteção contra a infecção [127].

No Brasil, a formulação da vacina recombinante da proteína A2 (Leish-Tec®) foi licenciada, sendo a terceira vacina profilática contra LVC, mas a primeira recombinante comercializada no mundo [125]. Recentemente, regimes de imunização em primatas à base de rA2 (Ad5-A2) seguido por rA2/rhIL-12 (Interleucina 12 humana recombinante/adsorvida em alúmen) foi avaliado e apresentaram após a infecção com *L. infantum*, uma notável proteção clínica [128]. Estes resultados tem aproximado a perspectiva de desenvolvimento da vacina contra LV humana uma realidade cada vez mais próxima.

Conclusão

A *Leishmania spp* por apresentar um ciclo de vida com alternância entre formas que se adaptam aos novos ambientes, promovem uma verdadeira maratona de mudanças, principalmente em sua superfície celular, o que lhes permite sobreviver nas novas condições. No entanto, essas mudanças podem levar a expressão de genes que favorecem a virulência e, portanto, o estabelecimento da infecção. A imunogenicidade destes componentes expressos e o grau de resposta do hospedeiro definem o quadro desta patologia. Além disso, essas moléculas também são fontes de pesquisa, para a busca de possibilidades terapêuticas que possam erradicar o desenvolvimento da doença leishmaniose nas suas mais diversificadas formas de apresentação. Embora, muito se tenha progredido com a compreensão da natureza molecular desses potenciais imunógenos, e evoluído nas várias propostas de vacinas com importantes resultados na imunização principalmente em cães, ainda assim, é necessário mais progressos no desenvolvimento das vacinas ou quimioterápicos contra a leishmaniose humana.

Referências

1. Bates PA (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 37:1097–1106. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003
2. World Health Organization (2010) Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva: World Health Organization. Available: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf. Accessed 2015 Ma.
3. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366:1561–1577. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67629-5
4. Badaro R, Jones TC, Lorenco R, et al. (1986) A Prospective Study of Visceral Leishmaniasis in an Endemic Area of Brazil. *J Infect Dis* 154:639–649. doi: 10.1093/infdis/154.4.639
5. McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G (2013) Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PLoS Pathog*. doi: 10.1371/journal.ppat.1003053
6. Srivastava A, Singh N, Mishra M, et al. (2012) Identification of TLR inducing Th1-responsive *Leishmania donovani* amastigote-specific antigens. *Mol Cell Biochem* 359:359–368. doi: 10.1007/s11010-011-1029-5
7. Khadem F, Uzonna JE (2014) Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. *Future Microbiol* 9:901–915. doi: 10.2217/fmb.14.43
8. Faria MS, Reis FCG, Lima APC a (2012) Toll-like receptors in *Leishmania* infections: Guardians or promoters? *J Parasitol Res*. doi: 10.1155/2012/930257
9. Casadevall A, Pirofski LA (1999) Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* 67:3703–3713.
10. Casadevall A, Pirofski L (2003) The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 1:17–24. doi: 10.1038/nrmicro732
11. Casadevall A, Pirofski LA (2009) Virulence factors and their mechanisms of action: The view from a damage-response framework. *J Water Health* 7:2–18. doi: 10.2166/wh.2009.036
12. Pirofski L, Casadevall A (2015) What is infectiveness and how is it involved in infection and immunity? *BMC Immunol* 16:13. doi: 10.1186/s12865-015-0076-1
13. Nylén S, Sacks D (2007) Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 28:378–384. doi: 10.1016/j.it.2007.07.004
14. Verma S, Kumar R, Katara GK, et al. (2010) Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PLoS One* 5:e10107. doi: 10.1371/journal.pone.0010107
15. Costa DL, Rocha RL, Carvalho RM a, et al. (2013) Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health* 107:78–87. doi: 10.1179/2047773213Y.00000000078
16. Costa CHN, Werneck GL, Costa DL, et al. (2010) Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev Soc Bras Med Trop* 43:386–392. doi: 10.1590/S0037-86822010000400010

17. Silva JM, Zacarias D a., De Figueirêdo LC, et al. (2014) Bone marrow parasite burden among patients with new world kala-azar is associated with disease severity. *Am J Trop Med Hyg* 90:621–626. doi: 10.4269/ajtmh.13-0376
18. Casadevall A, Pirofski L (2001) Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. *J Infect Dis* 184:337–344. doi: 10.1086/322044
19. McConville MJ, Handman E (2007) The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *Int J Parasitol* 37:1047–1051. doi: 10.1016/S0020-7519(07)00216-0
20. Rochette A, Raymond F, Corbeil J, et al. (2009) Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* 165:32–47. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.12.012
21. Chang KP, Chaudhuri G, Fong D (1990) Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu Rev Microbiol* 44:499–529. doi: 10.1146/annurev.micro.44.1.499
22. Moody SF, McConville MJ, Bacic A (1993) The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan. *J Biol Chemistry* 268:18457–18466.
23. Coelho-Finamore JM, Freitas VC, Assis RR, et al. (2011) *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *Int J Parasitol* 41:333–342. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.10.004
24. Ibraim IC, de Assis RR, Pessoa NL, et al. (2013) Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasit Vectors* 6:54. doi: 10.1186/1756-3305-6-54
25. Reiner NE (1994) Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol Today* 15:374–81. doi: 10.1016/0167-5699(94)90176-7
26. Rojas-Bernabé A, Garcia-Hernández O, Maldonado-Bernal C, et al. (2014) *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. *Parasitology* 141:788–800. doi: 10.1017/S0031182013002187
27. Kavooosi G, Ardestani SK, Kariminia a (2009) The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology* 136:1193–1199. doi: 10.1017/S0031182009990473
28. Descoteaux A, Turco SJ (1999) Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1455:341–352. doi: 10.1016/S0925-4439(99)00065-4
29. Chawla M, Vishwakarma R a (2003) Alkylacylglycerolipid domain of GPI molecules of *Leishmania* is responsible for inhibition of PKC-mediated c-fos expression. *J Lipid Res* 44:594–600. doi: 10.1194/jlr.M200296-JLR200
30. Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, et al. (2012) Glycoinositolphospholipids from *leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. *PLoS Negl Trop Dis* 6:1–11. doi: 10.1371/journal.pntd.0001543
31. Ilgs T, Overaths P, Fergusonon MAJ, et al. (1994) O- and N-Glycosylation of the *Leishmania mexicana*-secreted Acid Phosphatase.Characterization of a new class of

- phosphoserine-linked glycans. *Biochemistry* 269:24073–24081.
32. Ilg T, Stierhof YD, Craik D, et al. (1996) Purification and structural characterization of a filamentous, mucin-like proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* 271:21583–21596. doi: 10.1074/jbc.271.35.21583
 33. Rogers ME, Corware K, Müller I, Bates PA (2010) *Leishmania infantum* proteophosphoglycans regurgitated by the bite of its natural sand fly vector, *Lutzomyia longipalpis*, promote parasite establishment in mouse skin and skin-distant tissues. *Microbes Infect* 12:875–879. doi: 10.1016/j.micinf.2010.05.014
 34. Kavooosi G, Ardestani SK, Kariminia A, et al. (2008) *Leishmania major*: Effects of proteophosphoglycan on reactive oxygen species, IL-12, IFN γ and IL-10 production in healthy individuals. *Exp Parasitol* 120:62–66. doi: 10.1016/j.exppara.2008.04.022
 35. Stebeck CE, Beecroft RP, Singh BN, et al. (1995) Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Mol Biochem Parasitol* 71:1–13. doi: 10.1016/0166-6851(95)00022-S
 36. Lacerda DI, Cysne-Finkelstein L, Nunes MP, et al. (2012) Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *leishmania amazonensis* in murine macrophages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:238–245. doi: 10.1590/S0074-02762012000200014
 37. Carrillo E, Crusat M, Nieto J, et al. (2008) Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26:1902–1911. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.01.042
 38. Chaudhary R, Amit A, Yadav A, et al. (2014) Immunomodulation in human dendritic cells leads to induction of interferon-gamma production by *Leishmania donovani* derived KMP-11 antigen via activation of NF- κ B in Indian Kala-Azar patients. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2014/947606
 39. Beetham JK, Donelson JE, Dahlin RR (2003) Surface glycoprotein PSA (GP46) expression during short- and long-term culture of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 131:109–117. doi: 10.1016/S0166-6851(03)00197-X
 40. Lincoln LM, Ozaki M, Donelson JE, Beetham JK (2004) Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement. *Mol Biochem Parasitol* 137:185–189. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.05.004
 41. Salotra P, Duncan RC, Singh R, et al. (2006) Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Microbes Infect* 8:637–644. doi: 10.1016/j.micinf.2005.08.018
 42. R. Ramamoorth, Donelson JE, Paetz KE, et al. (1992) Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani* chagasi promastigotes to an infectious form. *J Biol Chem* 267:1888–1895.
 43. Hallé M, Gomez MA, Stuiblé M, et al. (2009) The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38mitogen-activated protein kinase inactivation. *J Biol Chem* 284:6893–6908. doi: 10.1074/jbc.M805861200
 44. Silverman JM, Clos J, de'Oliveira CC, et al. (2010) An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci* 123:842–852. doi: 10.1242/jcs.056465

45. Hassani K, Shio MT, Martel C, et al. (2014) Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of leishmania exosomes. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0095007
46. Vinet AF, Fukuda M, Descoteaux A (2008) The Exocytosis Regulator Synaptotagmin V Controls Phagocytosis in Macrophages. J Immunol 181:5289–5295. doi: 10.1093/imm/181/8/5289 [pii]
47. Arango Duque G, Fukuda M, Descoteaux A (2013) Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages. J Immunol 190:1737–1745. doi: 10.1093/jimmunol/120.2500
48. Arango Duque G, Fukuda M, Turco SJ, et al. (2014) Leishmania promastigotes induce cytokine secretion in macrophages through the degradation of synaptotagmin XI. J Immunol 193:2363–72. doi: 10.1093/jimmunol/130.3043
49. Mottram JC, Coombs GH, Alexander J (2004) Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. Curr Opin Microbiol 7:375–381. doi: 10.1016/j.mib.2004.06.010
50. Silva-Almeida M, Souza-Silva F, Pereira BAS, et al. (2014) Overview of the organization of protease genes in the genome of Leishmania spp. Parasit Vectors 7:387. doi: 10.1186/1756-3305-7-387
51. Pereira BAS, Britto C, Alves CR (2012) Expression of infection-related genes in parasites and host during murine experimental infection with Leishmania (Leishmania) amazonensis. Microb Pathog 52:101–108. doi: 10.1016/j.micpath.2011.11.004
52. Denise H, Poot J, Jiménez M, et al. (2006) Studies on the CPA cysteine peptidase in the Leishmania infantum genome strain JPCM5. BMC Mol Biol 7:42. doi: 10.1186/1471-2199-7-42
53. Somanna A, Mundodi V, Gedamu L (2002) Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from Leishmania donovani complex: Evidence for the activation of latent transforming growth factor β . J Biol Chem 277:25305–25312. doi: 10.1074/jbc.M203034200
54. Gonzalez-Leal IJ, Röger B, Schwarz A, et al. (2014) Cathepsin B in Antigen-Presenting Cells Controls Mediators of the Th1 Immune Response during Leishmania major Infection. PLoS Negl Trop Dis. doi: 10.1371/journal.pntd.0003194
55. Aguirre-García MM, Escalona-Montaña R, Bakalara N, et al. (2006) Leishmania major: detection of membrane-bound protein tyrosine phosphatase. Parasitology 132:641–9. doi: 10.1017/S0031182005009595
56. Almeida-Amaral EE d, Belmont-Firpo R, Vannier-Santos MA, Meyer-Fernandes JR (2006) Leishmania amazonensis: Characterization of an ecto-phosphatase activity. Exp Parasitol 114:334–340. doi: 10.1016/j.exppara.2006.04.011
57. Papadaki A, Politou AS, Smirlis D, et al. (2015) The *Leishmania donovani* histidine acid ecto-phosphatase *Ld* MAcP: insight into its structure and function. Biochem J 467:473–486. doi: 10.1042/BJ20141371
58. Dumas C, Ouellette M, Tovar J, et al. (1997) Disruption of the trypanothione reductase gene of Leishmania decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. EMBO J 16:2590–2598. doi: 10.1093/emboj/16.10.2590
59. Castro H, Sousa C, Novais M, et al. (2004) Two linked genes of Leishmania infantum

- encode tryparedoxins localised to cytosol and mitochondrion. *Mol Biochem Parasitol* 136:137–147. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.02.015
60. Iyer JP, Kaprakkaden A, Choudhary ML, Shaha C (2008) Crucial role of cytosolic tryparedoxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Mol Microbiol* 68:372–391. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06154.x
 61. Romao S, Castro H, Sousa C, et al. (2009) The cytosolic tryparedoxin of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival. *Int J Parasitol* 39:703–711. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.11.009
 62. Menezes Cabral S, Leal Silvestre R, Moreira Santarém N, et al. (2008) A *Leishmania infantum* cytosolic tryparedoxin activates B cells to secrete interleukin-10 and specific immunoglobulin. *Immunology* 123:555–565. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02725.x
 63. Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, et al. (1997) Heat Shock Protein-Peptide Complexes, Reconstituted In Vitro, Elicit Peptide-specific Cytotoxic T Lymphocyte Response and Tumor Immunity. *J Exp Med* 186:1315–1322. doi: 10.1084/jem.186.8.1315
 64. Rafati S, Gholami E, Hassani N, et al. (2007) *Leishmania major* heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. *Vaccine* 25:4159–4169. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.03.006
 65. MacFarlane J, Blaxter ML, Bishop RP, et al. (1990) Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *Eur J Biochem* 190:377–384. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15586.x
 66. Rico AI, Gironès N, Fresno M, et al. (2002) The heat shock proteins, Hsp70 and Hsp83, of *Leishmania infantum* are mitogens for mouse B cells. *Cell Stress Chaperones* 7:339–46. doi: 10.1379/1466-1268(2002)007<0339:THSPHA>2.0.CO;2
 67. Kaur J, Kaur T, Kaur S (2011) Studies on the protective efficacy and immunogenicity of Hsp70 and Hsp83 based vaccine formulations in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice. *Acta Trop* 119:50–56. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.04.007
 68. Soto M, Requena JM, Quijada L, et al. (1995) Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett* 48:209–214. doi: 10.1016/0165-2478(95)02473-5
 69. Meddeb-Garnaoui A, Toumi A, Ghelis H, et al. (2010) Cellular and humoral responses induced by *Leishmania* histone H2B and its divergent and conserved parts in cutaneous and visceral leishmaniasis patients, respectively. *Vaccine* 28:1881–1886. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.11.075
 70. Singh R, Kumar D, Duncan RC, et al. (2010) Overexpression of histone H2A modulates drug susceptibility in *Leishmania* parasites. *Int J Antimicrob Agents* 36:50–57. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.03.012
 71. Charest H, Matlashewski G (1994) Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol* 14:2975–2984. doi: 10.1128/MCB.14.5.2975.Updated
 72. Zhang WW, Matlashewski G (2001) Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: Involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol Microbiol* 39:935–948. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02286.x

73. McCall L-I, Matlashewski G (2010) Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. *Mol Microbiol* 77:518–30. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07229.x
74. Sarkar A, Ghosh S, Pakrashi S, et al. (2012) Strains Causing Self-Healing Cutaneous Leishmaniasis Have Greater Susceptibility Towards Oxidative Stress. *Free Radic Res* 46:665–673. doi: 10.3109/10715762.2012.668186
75. McCall LI, Matlashewski G (2012) Involvement of the *Leishmania donovani* virulence factor A2 in protection against heat and oxidative stress. *Exp Parasitol* 132:109–115. doi: 10.1016/j.exppara.2012.06.001
76. Sharma P, Gurusurthy S, Duncan R, et al. (2010) Comparative in vivo expression of amastigote up regulated *Leishmania* genes in three different forms of Leishmaniasis. *Parasitol Int* 59:262–264. doi: 10.1016/j.parint.2009.11.003
77. Zhang WW, Ramasamy G, McCall LI, et al. (2014) Genetic Analysis of *Leishmania donovani* Tropism Using a Naturally Attenuated Cutaneous Strain. *PLoS Pathog*. doi: 10.1371/journal.ppat.1004244
78. Rogers ME (2012) The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front Microbiol* 3:1–13. doi: 10.3389/fmicb.2012.00223
79. McCall LI, Zhang WW, Dejgaard K, et al. (2015) Adaptation of *leishmania donovani* to cutaneous and visceral environments: In vivo selection and proteomic analysis. *J Proteome Res* 14:1033–1059. doi: 10.1021/pr5010604
80. Ghosh A, Zhang WW, Matlashewski G (2001) Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine* 20:59–66. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00322-X
81. Zanin FHC, Coelho E a F, Tavares C a P, et al. (2007) Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect* 9:1070–1077. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.012
82. Wu Y, El Fakhry Y, Sereno D, et al. (2000) A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 110:345–357. doi: 10.1016/S0166-6851(00)00290-5
83. Rochette A, McNicoll F, Girard J, et al. (2005) Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol* 140:205–220. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.01.006
84. de Paiva RMC, Grazielle-Silva V, Cardoso MS, et al. (2015) Amastin Knockdown in *Leishmania braziliensis* Affects Parasite-Macrophage Interaction and Results in Impaired Viability of Intracellular Amastigotes. *PLoS Pathog* 11:1–24. doi: 10.1371/journal.ppat.1005296
85. Alce TM, Gokool S, McGhie D, et al. (1999) Expression of hydrophilic surface proteins in infective stages of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 102:191–196. doi: 10.1016/S0166-6851(99)00074-2
86. Moreno J, Nieto J, Masina S, et al. (2007) Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine* 25:5290–5300. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.05.010

87. Depledge DP, MacLean LM, Hodgkinson MR, et al. (2010) Leishmania-Specific Surface Antigens Show Sub-Genus Sequence Variation and Immune Recognition. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e829. doi: 10.1371/journal.pntd.0000829
88. Zackay A, Nasereddin A, Takele Y, et al. (2013) Polymorphism in the HASPB Repeat Region of East African Leishmania donovani Strains. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2031. doi: 10.1371/journal.pntd.0002031
89. Sádlová J, Price HP, Smith BA, et al. (2010) The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite Leishmania major in its sand fly vector, Phlebotomus papatasi. *Cell Microbiol* 12:1765–1779. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01507.x
90. Moore B, Miles AJ, Guerra-Giraldez C, et al. (2011) Structural basis of molecular recognition of the Leishmania Small Hydrophilic Endoplasmic Reticulum-associated Protein (SHERP) at membrane surfaces. *J Biol Chem* 286:9246–9256. doi: 10.1074/jbc.M110.130427
91. MacLean LM, O'Toole PJ, Stark M, et al. (2012) Trafficking and release of Leishmania metacyclic HASPB on macrophage invasion. *Cell Microbiol* 14:740–761. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01756.x
92. Portman N, Gull K (2010) The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function. *Int J Parasitol* 40:135–148. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.10.005
93. Santrich C, Moore L, Sherwin T, et al. (1997) A motility function for the paraflagellar rod of Leishmania parasites revealed by PFR-2 gene knockouts. *Mol Biochem Parasitol* 90:95–109. doi: 10.1016/S0166-6851(97)00149-7
94. Mojtahedi Z, Clos J, Kamali-Sarvestani E (2008) Leishmania major: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Exp Parasitol* 119:422–429. doi: 10.1016/j.exppara.2008.04.008
95. Gonzalez-Aseguinolaza G, Taladriz S, Marquet A, Larraga V (1999) Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from Leishmania infantum. *Eur J Biochem* 259:909–916. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00122.x
96. Hammoudeh N, Kweider M, Abbady AQ, Soukkarieh C (2014) Sequencing and Gene Expression Analysis of Leishmania tropica LACK Gene. *Iran J Parasitol* 9:574–583.
97. Sinha S, Kumar A, Sundaram S (2013) A comprehensive analysis of LACK (Leishmania homologue of receptors for activated C kinase) in the context of Visceral Leishmaniasis. *Bioinformation* 9:832–7. doi: 10.6026/97320630009832
98. Launois P, Pingel S, Himmelrich H, et al. (2007) Different epitopes of the LACK protein are recognized by V β 4 V α 8 CD4+ T cells in H-2b and H-2d mice susceptible to Leishmania major. *Microbes Infect* 9:1260–1266. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.017
99. Gómez-Arreaza A, Acosta H, Barros-Álvarez X, et al. (2011) Leishmania mexicana: LACK (Leishmania homolog of receptors for activated C-kinase) is a plasminogen binding protein. *Exp Parasitol* 127:752–761. doi: 10.1016/j.exppara.2011.01.008
100. Webb JR, Campos-Neto A, Skeiky YAW, Reed SG (1997) Molecular characterization of the heat-inducible LmSTII protein of Leishmania major. *Mol Biochem Parasitol* 89:179–193. doi: 10.1016/S0166-6851(97)00115-1

101. Webb JR, Campos-Neto A, Ovendale PJ, et al. (1998) Human and Murine Immune Responses to a Novel Leishmania major Recombinant Protein Encoded by Members of a Multicopy Gene Family. *Infect Immun* 66:3279–3289.
102. Campos-Neto A, Webb JR, Greeson K, et al. (2002) Vaccination with Plasmid DNA Encoding TSA / LmSTII Leishmanial Fusion Proteins Confers Protection against Leishmania major Infection in Susceptible BALB / c Mice. *Society* 70:2828–2836. doi: 10.1128/IAI.70.6.2828
103. Fujiwara RT, Vale AM, França da Silva JC, et al. (2005) Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTII) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 36:827–838. doi: 10.1051/vetres:2005033
104. Cordin O, Banroques J, Tanner NK, Linder P (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367:17–37. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.019
105. Skeiky YAW, Guderian JA, Benson DR, et al. (1995) A Recombinant Leishmania Antigen that Stimulates Human Peripheral Blood Mononuclear Cells to Express a Th1-Type Cytokine Profile and to Produce Interleukin 12. *J Exp Med* 181:1527–1537.
106. Skeiky Y a, Kennedy M, Kaufman D, et al. (1998) LeIF: a recombinant Leishmania protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J Immunol* 161:6171–6179.
107. Barhoumi M, Tanner NK, Banroques J, et al. (2006) Leishmania infantum LeIF protein is an ATP-dependent RNA helicase and an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast. *FEBS J* 273:5086–5100. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05506.x
108. Kushawaha PK, Gupta R, Sundar S, et al. (2011) Elongation factor-2, a Th1 stimulatory protein of Leishmania donovani, generates strong IFN- γ and IL-12 response in cured Leishmania-infected patients/hamsters and protects hamsters against Leishmania challenge. *J Immunol* 187:6417–27. doi: 10.4049/jimmunol.1102081
109. Barhoumi M, Garnaoui A, Kaabi B, et al. (2011) Leishmania infantum LeIF and its recombinant polypeptides modulate interleukin IL-12p70, IL-10 and tumour necrosis factor production by human monocytes. *Parasite Immunol* 33:583–588. doi: 10.1111/j.1365-3024.2011.01320.x
110. Koutsoni O, Barhoumi M, Guizani I, Dotsika E (2014) Leishmania eukaryotic initiation factor (LeIF) inhibits parasite growth in murine macrophages. *PLoS One* 9:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0097319
111. Wilson ME, Ali KM, Donelson JE, et al. (1995) A recombinant Leishmania chagasi antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. *63:2062–2069.*
112. Mahmoudzadeh-Niknam H, Abrishami F, Doroudian M, et al. (2010) Complete conservation of an immunogenic gene (lcr1) in Leishmania infantum and Leishmania chagasi isolated from Iran, Spain and Brazil. *J Vector Borne Dis* 47:204–210.
113. Niknam HM, Abrishami F, Doroudian M, et al. (2014) Immune responses of Iranian patients with visceral leishmaniasis and recovered individuals to LCR1 of Leishmania infantum. *Clin Vaccine Immunol* 21:518–525. doi: 10.1128/ CVI.00711-13
114. Campos-Neto a, Soong L, Cordova JL, et al. (1995) Cloning and expression of a Leishmania donovani gene instructed by a peptide isolated from major histocompatibility complex class II molecules of infected macrophages. *J Exp Med* 182:1423–1433. doi: 10.1084/jem.182.5.1423

115. Sundar S, Rai M (2002) Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:951–958. doi: 10.1128/CDLI.9.5.951
116. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S (2011) Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105:1–6. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.09.006
117. Ministério da Saúde (2006) Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 1st ed. Brasília
118. Sundar S, Chakravarty J (2010) Antimony Toxicity. *Int J Environ Res Public Health* 7:4267–4277. doi: 10.3390/ijerph7124267
119. Croft SL, Olliaro P (2011) Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect* 17:1478–1483. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x
120. Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, et al. (2007) Phase 4 Trial of Miltefosine for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis* 196:591–598. doi: 10.1086/519690
121. Sundar S, Sinha PK, Rai M, et al. (2011) Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: An open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* 377:477–486. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62050-8
122. Schroeder J, Aebischer T (2011) Vaccines for leishmaniasis: from proteome to vaccine candidates. *Hum Vaccin* 7 Suppl:10–15. doi: 10.4161/hv.7.0.14556
123. Kedzierski L, Zhu Y, Handman E (2006) Leishmania vaccines: progress and problems. *Parasitology* 133 Suppl:S87–S112. doi: 10.1017/S0031182006001831
124. Singh B, Sundar S (2012) Leishmaniasis: Vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* 30:3834–3842. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.03.068
125. Fernandes AP, Coelho EAF, Machado-Coelho GLL, et al. (2012) Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational, update and perspectives. *Curr Opin Microbiol* 15:476–485. doi: 10.1016/j.mib.2012.05.002
126. Fernandes AP, Costa MMS, Coelho EAF, et al. (2008) Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26:5888–5895. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.05.095
127. Alves CF, de Amorim IFG, Moura EP, et al. (2009) Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 128:349–358. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.11.020
128. Grimaldi G, Teva A, Porrozzi R, et al. (2014) Clinical and Parasitological Protection in a *Leishmania infantum*-Macaque Model Vaccinated with Adenovirus and the Recombinant A2 Antigen. *PLoS Negl Trop Dis*. doi: 10.1371/journal.pntd.0002853

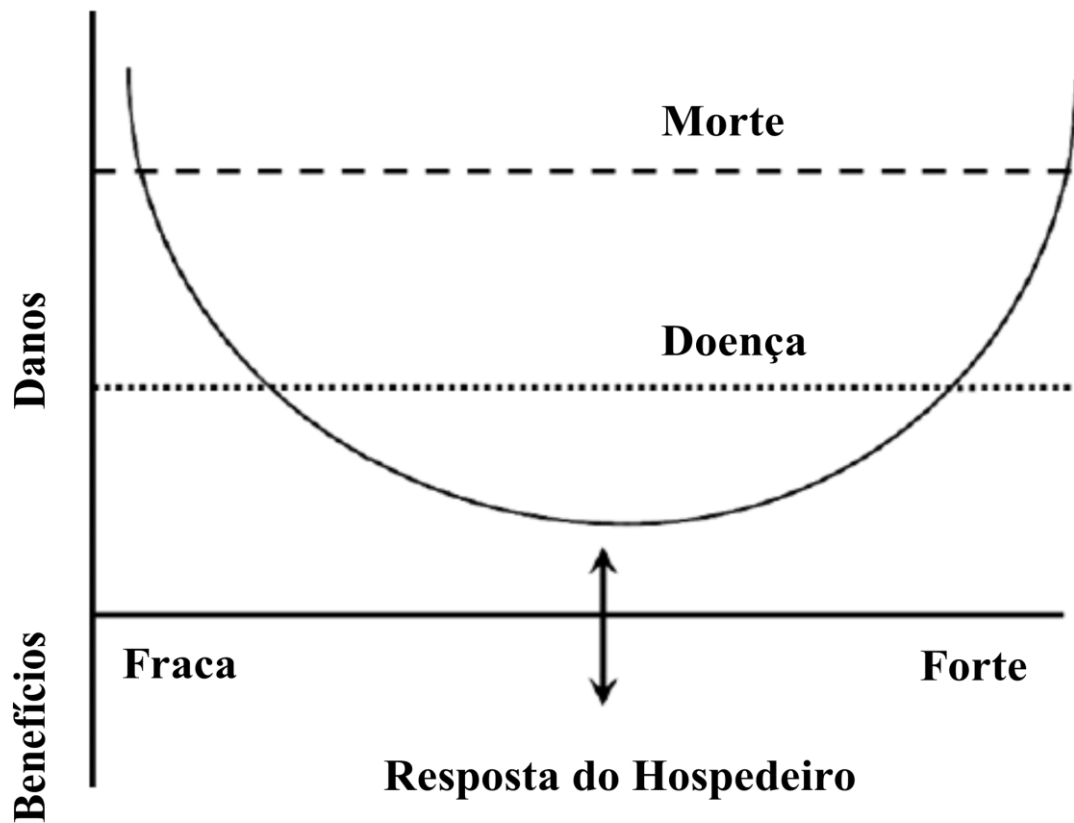


Figura 1: Curva básica de enquadramento danos-resposta da patogênese microbiana. Adaptada de Casadevall & Pirofski, 2003;2009. A seta indica que a posição da curva é variável, e depende da interação particular entre parasita-hospedeiro. O eixo y indica a danos no hospedeiro como uma função da resposta do próprio hospedeiro. Neste esquema, o dano pode ocorrer em função da resposta do hospedeiro, mas é ampliado em ambos os extremos, que pode resultar de uma resposta imune fraca induzida por FV que possam permitir a invasividade, aumento da CP e estabelecimento da infecção pela *Leishmania*. Por outro lado, uma resposta imune forte, pode gerar danos teciduais graves ocasionados por uma resposta inflamatória exagerada e progressivamente resultar em morte.

Tabela 1: Fatores de virulência estudados em espécies de *Leishmanias*.

Fator de virulência	Espécie	Modelo Experimental	Função/efeito	Referências
LPG	<i>L. major</i> <i>L. mexicana</i>	In vitro (PBMCs humanas)	Manipulação de vias de transduções de sinais, aumento de citocinas.	[26,27]
GIPLs	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. brasiliensis</i>	In vitro (Macrófagos murinos)	Inibição de vias de sinalização e da iNOS, indução da produção de citocinas.	[29,30]
PPGs	<i>L. infantum</i> <i>L. major</i>	In vivo (Modelo murino) In vitro (PBMCs humanas)	Facilita a infecção, a visceralização e a proliferação do parasita. Além da indução de ROS e IL-10, e em menor grau de IFN- γ e IL-12	[33,34]
KMP-11	<i>L. amazonensis</i> <i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i>	In vitro (Macrófagos murinos) In vivo (Modelo canino) In vitro (PBMCs humanas)	estimulação da produção de IL-10, aumento da atividade da arginase e da inibição da síntese de NO. Aumento da replicação do parasita e de citocinas como IFN- γ	[36-38]
PSA	<i>L. chagasi</i> (= <i>L. infantum</i>) <i>L. donovani</i>	In vitro (Soro humano) In vitro (lesão tecidual humana)	Resistência a lise mediada pelo sistema complemento e proliferação celular do parasita	[40,41]
Gp63	<i>L. major</i> <i>L. donovani</i>	In vitro (Macrófagos murinos)	Alterações de vias de transduções de sinais, diminuição da resposta inflamatória, indução de TNF e IL-6 no estabelecimento da infecção	[45,48]
Cisteínas-proteases	<i>L. infantum</i> <i>L. chagasi</i>)	In vitro (Macrófagos de linhagem humana - U937)	Importante na IPH e sobrevivência nos macrófagos Expressão de citocinas Th1	[52-54]

	<i>L. major</i>	In vitro (Macrófagos murinos)		
Fosfatase ácida (AcP)	<i>L. donovani</i>	In vitro (Macrófagos murinos)	Manipulação de vias de sinais	[57]
Sistemas: (TR/T(SH)₂) e (TXN/TXNP_x)	<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i>	In vitro (Promastigota) In vitro (Macrófagos murinos)	Desintoxicação pelo H ₂ O ₂ , aumento de citocinas IL-10 e da CP em macrófagos	[60-62]
HSP	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	In vitro (Soro humano) In vitro (Macrófagos murinos)	Antigênica e estimula a resposta imune humoral com CP reduzida e aumento de citocinas Th1	[65-67]
Histonas	<i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i> <i>L. major</i>	In vitro (Soro canino) In vitro (Macrófagos murinos) In vitro (PBMCs humanas)	Indução de resposta humoral, resistência aos antimônios, proliferação celular com respostas Th1	[68-70]
Proteína A2	<i>L. donovani</i>	In vitro In vitro (Macrófagos murinos)	Visceralização, proteção ao estresse térmico e oxidativo. Indução de resposta Th1	[72-75, 80,81]
Amastina	<i>L. brasiliensis</i>	In vitro (Macrófagos murinos) In vivo (murinos)	Auxilia na IPH Favorecendo a sobrevivência e proliferação celular dos parasitas,	[84]
HASP/SHERP	<i>L. donovani</i> <i>L. brasiliensis</i> <i>L. major</i>	In vitro (Soro humano/canino) In vitro	Diferenciação durante a metaciclogênese, Imunógeno de células B	[85-87, 89-91]
Rod paraflagelar (PFR)	<i>L. mexicana</i> <i>L. major</i>	In vitro	Motilidade e ligação do patógeno	[93,94]

LACK	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. major</i>	In vitro In vivo (Modelo murino)	Interação com proteínas envolvidas no metabolismo do DNA e RNA, processamento de sinais de transdução e regulação do ciclo celular. Ligação e ativação do plasminogênio	[95, 98, 99]
LmSTI1 e TSA	<i>L. major</i> <i>L. chagasi</i>	In vitro (PBMCs humanas e murinos) In vivo (Modelo canino)	Proteína antigênica, indução de resposta Th1	[101-103]
LeIF	<i>L. brasiliensis</i> <i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i> <i>L. major</i>	In vitro (PBMCs humanas) In vitro (Esplenócitos murinos)	Indução de resposta Th1 mediada por IL-12, IFN- γ , TNF- α	[105-108]
Antígenos Lcr1 e Ldp23	<i>L. chagasi</i> <i>L. donovani</i>	In vitro (Modelo murino) In vitro (Macrófagos murinos)	Indução de resposta Th1/ IFN- γ	[111,114]

Confirmation of your submission to BMC Genomics - GICS-D-16-00714

BMC Genomics Editorial Office
GICS-D-16-00714

Assessment of the genic expression profile of promastigotes in axenic culture of *L. infantum* strains from patients with severe and non-severe disease

Valéria Simeão Oliveira, Vladimir Costa Silva, PhD; Valdir de Queiroz Balbino, PhD; Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior, PhD; Raul Maia Falcão; Carlos Henrique Nery Costa, PhD

BMC Genomics

Dear

Mrs Oliveira, Thank you for submitting your manuscript 'Assessment of the genic expression profile of promastigotes in axenic culture of *L. infantum* strains from patients with severe and non-severe disease' to BMC Genomics.

The submission id is: GICS-D-16-00714. Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following: website: <http://gics.edmgr.com/>

If you have forgotten your username or password please use the "Send Login Details" link to get your login information. For security reasons, your password will be reset.

Best wishes,

Editorial Office BMC Genomics

<http://www.biomedcentral.com/bmcgenomics>

5.2 Avaliação do perfil de expressão gênica de promastigotas em cultura axênica de cepas de *L. infantum* de pacientes com doença grave e não grave

Assessment of the genic expression profile of promastigotes in axenic culture of *L. infantum* strains from patients with severe and non-severe disease

Valéria C. S. Oliveira^{1**¶}, Vladimir C. Silva^{1**¶}, ¶ Valdir de Queiroz Balbino², Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior², Raul Maia Falcão², Carlos Henrique N. Costa^{1*}.

¹Laboratório de Leishmanioses, Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella, Teresina, Piauí, Brasil.

²Laboratório de Bioinformática e de Biologia Evolutiva, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. Pernambuco, Brasil.

*Autores Correspondentes

E-mails: valeria.cso@hotmail.com, vladimir.costa@gmail.com, chnc@gmail.com

Resumo

Background: A *Leishmania infantum* é um protozoário parasita que causa a doença leishmaniose visceral (LV) cuja clinica apresenta evoluções variáveis, podendo ser fatal se não tratada. Fatores relacionados com o hospedeiro e o parasita são importantes para o estabelecimento da doença, uma vez que, os fatores de virulência desenvolvidos pela *Leishmania*, facilitam a invasão e o crescimento destes organismos nos hospedeiros. Com o objetivo de avaliar genes diferencialmente expressos em promastigotas de *L. infantum* de 20 pacientes classificados como grave e não grave, foi realizado o sequenciamento transcriptômico.

Resultados: Através da técnica de RNASeq (Illumina) e das análises de bioinformática dos dados produzidos, foram gerados 8364 transcritos que foram mapeados no genoma de referência. A análise de expressão diferencial entre os grupos grave e não grave mostrou uma baixa correlação da expressão diferencial entre os genes. No grupo grave, apenas 3 genes (Linj.28.29.50; Linj. 151240 e o Linj.23.rRNA1) foram identificados up-regulados e não foram expressos no grupo não grave. No grupo não grave, 50 genes foram expressos up-regulados.

Conclusão: Neste trabalho foram identificados e anotados genes upregulados expressados tanto no grupo grave quanto no grupo não grave. O gene Hsp 70 e o gene transportador de nucleosídeo foram fortemente expressos, apenas, no grupo grave. O gene Hsp 70 como outros que foram expressos são sugestivos como fatores de virulência e importantes na efetividade da infecção do parasita. A baixa expressão diferencial entre os grupos grave e não grave possivelmente foi devido às condições de cultivo que foram apropriadas para a expressão dos genes de ambos os grupos.

Palavras chave: Leishmaniose visceral, Leishmaniose visceral grave, *Leishmania infantum*, Fatores de virulência, RNA-Seq, Expressão de gene.

Abstract

Background: *Leishmania infantum* is a parasitic protozoan that causes the disease visceral leishmaniasis (VL) whose clinical presents variable evolution, and can be deadly if left untreated. Related factors with the host and parasite are important for the establishment of the disease, since the virulence factors developed by the *Leishmania*, make ease the invasion and growth of these organisms in the hosts .With the aim of evaluating differentially expressed genes in promastigotes of *L. infantum* of 20 patients classified as severe and non-severe, it was performed the transcriptome sequencing.

Results: Through the RNASeq (Illumina) technique and bioinformatics analysis from the produced data, 8364 transcripts were generated where were mapped in the genome of reference. The analysis of differential expression between the severe and non-severe groups showed off a low correlation of differential expression between genes. In the severe group, only 3 genes (Linj.28.29.50, Linj.151240 and Linj.23.rRNA1) were identified up-regulated and were not expressed in the non-severe group. In the non-severe group, 50 genes were expressed up-regulated.

Conclusion: In this work, were identified and wrote down upregulated genes expressed as in the severe group as non-severe group. The Hsp 70 gene and the gene nucleoside transporter were strongly expressed only in the severe group. O Hsp 70 gene and others who have been expressed are suggestive as virulence factors and important in the effectiveness of parasite infection. The low differential expression between the severe and non-severe groups possibly was due to the growing conditions which were appropriate for the expression of the genes of both groups.

Keywords: Visceral leishmaniasis, Severe visceral leishmaniasis, *Leishmania Infantum*, Virulence Factors, RNA-Seq, Gene Expression.

1. Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave transmitida por vetor, flebotomíneo, que atinge seres humanos e outros mamíferos sendo causada por parasitas do complexo da *Leishmania donovani* [1,2]. De acordo com a nova revisão taxonômica existem apenas duas formas clínicas que são causadas pelas espécies, *Leishmania infantum* que causa leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) sendo distribuída na Ásia, Oriente Médio, Europa e na América Latina, e a *Leishmania donovani* que causa leishmaniose visceral antroponótica (LVA) sendo distribuída na Ásia, Oriente Médio e África [3–5]. Estima-se que há 0.5 milhões de casos de LV e mais de 50.000 mortes por ano concentrados principalmente na Índia, Nepal, Bangladesh, Sudão e Brasil [6–8] No continente americano, 90% dos casos de LVZ ocorrem no Brasil e o principal vetor é o *Lutzomyia longipalpis* [9–13].

Clinicamente a LV apresenta evoluções variáveis com sintomatologia caracterizada por febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e hipergamoglobulinemia, ou seja, todos os sinais clássicos da LV [14], e é geralmente fatal se não for tratada, podendo progredir para a devastadora doença grave [15–18], que pode ser reforçada pela a carga parasitária aumentada na medula óssea, sangramentos e infecções bacterianas [19–21].

Imunologicamente, ocorre uma forte produção de citocinas, como o IFN- γ , que parece ser crucial para o controle dos parasitas e para o desenvolvimento de resistência à infecção [22], no entanto, além do IFN- γ , várias outras citocinas e quimiocinas são produzidas em resposta à infecção por LV como, TNF, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-33, IP-10 e MIG observadas no soro de pacientes [23,24]. Dessa forma, a infecção ativa não é devido a ausência de uma resposta pro-inflamatória, mas está associada com a presença de ambas as citocinas Th1 e Th2 de maneira que não há uma dicotomia clara em relação a essas citocinas e seus impactos sobre a resistência e suscetibilidade à doença em humanos ou em modelos experimentais com LV [24,25]. Além da secreção de citocinas em resposta a reatividade antígeno-específica, fatores genéticos do hospedeiro bem como a espécie e a virulência do parasita infectante também são determinantes para a apresentação clínica final da doença [26,27].

Para estabelecer a infecção, as promastigotas metacíclicas devem entrar nos macrófagos e evitar o desencadeamento da resposta do hospedeiro e os eventos celulares que ocorrem entre macrófagos e parasitas influenciando o destino da infecção [28]. As *Leishmanias* desenvolveram uma série de mecanismos sofisticados para subverter as atividades leishmanicidas dos macrófagos, alterando a expressão de genes para citocinas,

quimiocinas, fatores de transcrição, receptores de membrana e as moléculas envolvidas na transdução de sinal em células infectadas [29,30].

Esses mecanismos são induzidos pelos vários componentes de superfície ou secretados da *Leishmania* [31–34] que se expressam nas diferentes fases de desenvolvimento do parasita. A fase promastigota (procíclica e metacíclica) extracelular e flagelada que vive no trato digestivo dos flebotomíneos e a fase amastigota intracelular obrigatória que vive dentro dos vacúolos fagolisossômicos dos macrófagos dos mamíferos [35–37]. Assim, esses componentes, fatores de virulência (FV), são considerados determinantes-chaves que modulam respostas tanto no inseto vetor quanto no hospedeiro mamífero, embora essa propriedade do patógeno esteja relacionada a susceptibilidade e resistência do hospedeiro mamífero para o estabelecimento da infecção [38,39].

Abordagens de larga escala para identificar moléculas e modificações nas vias biológicas desencadeadas pelo parasitismo intracelular estão em crescente uso e a aplicação do transcriptoma para estudar a interação patógeno-hospedeiro, já contribuiu com importantes avanços na compreensão dos mecanismos da patogênese de uma ampla variedade de organismos [40]. Além disso, o perfil de expressão de genes de vários parasitas protozoários, como a *Leishmania*, foram estudados e identificados, através de técnicas de larga escala [41–47].

Recentemente, com o desenvolvimento de novos métodos de sequenciamento de nova geração (NGS), como o RNASeq, que tem revolucionado a forma como são analisados os transcriptomas eucarióticos tanto com relação ao mapeamento quanto a quantificação, foram gerados dados que possibilitaram a análise diferencial da expressão de genes, ao longo do ciclo de vida e entre diferentes espécies de *Leishmanias* [48,49], revelando a interpretação dos elementos funcionais do genoma, para a descoberta de componentes moleculares de células e tecidos, e para o entendimento dos estágios de desenvolvimento e das doenças [48].

Neste trabalho, foi utilizado a tecnologia NGS – RNASeq para realização do sequenciamento do transcriptoma de 24 amostras de RNA total de cepas de promastigotas de *L. infantum* de pacientes previamente classificados como grave (LVG) e não grave (LVNG) com o objetivo de avaliar a expressão diferencial dos genes nestes grupos. Do total das 24 amostras sequenciadas, 4 amostras foram descartadas por não atenderem as devidas condições de análises. Das 20 amostras restantes analisadas, foram gerados dados, onde 8364 genes foram mapeados pelos transcritos em relação ao genoma de referência (8381 genes). Foram identificados vários genes expressados pelos os grupos grave e não grave, porém a expressão

diferencial entre os grupos foi mínima. O grupo grave diferencialmente expressou apenas 3 genes e estes são apontados como importantes na infectividade e na virulência destes parasitas. Dentre os genes identificados no grupo grave a proteína Hsp70 e um transportador de nucleosídeo se destacaram com maior expressão e não foram expressos no grupo não grave. Apesar da baixa expressão diferencial, esses genes, como possíveis fatores de virulência, podem ser responsáveis pelo o estabelecimento da infecção bem como a resistência as drogas leishmanicidas. A correlação entre os genes expressos e o desenvolvimento dos desfechos clínicos da LV, em especial da doença grave, ampliará o conhecimento sobre a patogênese desta doença além de gerar alvos futuros a serem explorados com a finalidade de se desenvolver estratégias para intervir no processo infeccioso e auxiliar no controle e erradicação desta doença.

2. Materiais e Métodos

2.1 Origem das amostras e critérios de escolha

As amostras de *L. infantum* obtidas de isolados de aspirado medular que foram utilizadas neste trabalho são provenientes da coleta rotineira realizada pelo Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), sediado na capital, Teresina, Estado do Piauí, Brasil, para fins de diagnóstico e tratamento de pacientes, e são mantidas crio-preservadas em nitrogênio líquido.

Os critérios de seleção das amostras para inclusão no estudo foram os seguintes: amostras de pacientes com Leishmaniose Visceral Não Grave (LVNG) e amostras de pacientes com Leishmaniose Visceral Grave (LVG). A classificação seguiu critérios já estabelecidos pelo Ministério da Saúde do Brasil [50] e implantados nesta Instituição. As amostras foram selecionadas de modo aleatório independente do gênero e faixa etária dos pacientes.

2.2 Considerações Éticas:

O protocolo e o termo de consentimento esclarecido, obtido de todos os indivíduos participantes ou do seu responsável legal, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Piauí sob o número 0116/2005. O estudo foi conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil.

2.3 Isolamento e cultura de promastigotas:

As cepas de *L. infantum* proveniente dos aspirados medular foram isoladas e congeladas conforme protocolos já estabelecidos [51]. Foi realizada a reativação e cultivo de 24 cepas onde 14 são de pacientes com LVNG e 10 são de pacientes com LVG em meio Schneider's (Sigma-Aldrich) em pH 7,2 suplementado com soro fetal bovino inativado (10%), urina humana (2%) e mantido a 26 °C. A expansão das promastigotas por aproximadamente 7 dias foi monitorada e quantificada por contagem, em câmara de Neubauer atingindo uma densidade média de $4,2 \times 10^7$ células por ml de meio na fase log final do crescimento.

2.4 - Isolamento do RNA total

As células foram lavadas três (3) vezes com solução de NaCl a 0,9% para retirada do meio, e precipitadas por centrifugação a 3000 rpm durante 10 min. a 4°C. Foi descartado o sobrenadante e o *pellet* foi resuspendido com tampão de lise RLT (Mini kit RNeasy® - Qiagen). Para garantir uma melhor pureza do RNA extraído este foi tratado com DNase (Qiagen) e purificado com o Mini kit RNeasy® (Qiagen) conforme as instruções do fabricante. A quantificação das amostras foi realizada por absorvância a 260 nm utilizando o Nanodrop ND 2000 espectrofotômetro (Thermo Scientific) e a avaliação da integridade do RNA foi verificada em um Bioanalyzer (Agilent 2100) de acordo com as instruções dos fabricantes. Posteriormente as amostras foram congeladas (- 80° C).

2.5 - Construção da biblioteca transcriptômica e sequenciamento (RNASeq)

A construção das bibliotecas transcriptômicas e o sequenciamento foram realizados no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LaCTAD) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – SP, Brasil. Para a construção das bibliotecas das 24 amostras de RNA total, foi utilizado o kit TruSeq RNA Sample Prep v2 (Illumina, San Diego, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas foram submetidas à corrida de sequenciamento (RNASeq) no modo rápido, Paired-End (PE) com um comprimento de leitura (reads) de 100 pb (pares de bases) em 1 lane (24 amostras por Lane) com cobertura de 12,5M reads por amostra, totalizando 300M reads nas 24 amostras utilizando o sistema HiSeq2500 da plataforma Illumina de acordo com o protocolo do fabricante. As sequências de todas as bibliotecas de cDNA serão disponibilizadas.

2.6 – RNASeq e processamento dos dados:

As análises de bioinformática foram realizadas em dois servidores. No LaCTAD (Unicampi-SP) e no Laboratório de Bioinformática e de Biologia Evolutiva – (LABBE) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – PE. Brasil. As reads (leituras) produzidas pelo sequenciamento foram alinhadas ao genoma de referência, *Leishmania infantum* JPCM5 (versão 9.0 Trityp DB), seguindo um fluxo de eventos já estabelecidos [52]. O mapeamento foi realizado com a ferramenta TopHat (v. 2.0) e em seguida, os transcritos foram gerados e montados através da ferramenta Cufflinks (v. 2.2.1) [53]. A ferramenta TopHat utilizou como parâmetros um guia de anotação dos transcritos e também utilizou um corte dos genes que tiveram abundância gênica abaixo de 40%. Através da ferramenta Cuffdiff, [54], foi calculada

a abundância dos transcritos onde as read counts (quantidade de reads que foram mapeados com o genoma de referência) foram normalizadas pela métrica do FPKM (Fragmentos por quilobases de éxons por milhões de fragmentos mapeados) e posteriormente, foi realizada a análise da expressão diferencial entre os grupos grave e não grave (52). Foi aplicada a correção *False Discovery Rate* (FDR) visando corrigir os erros associados a múltiplos testes [55]. Para a seleção dos genes diferencialmente expressos, foram aceitos valores com $FDR \leq 10\%$. A ferramenta chamada CummeRbund (v. 2.7.2), foi utilizada para processar os arquivos de saída do Cuffdiff e dá uma saída de qualidade para a visualização dos dados (plots e figuras) [52,54].

3. Resultados

Neste estudo, de um total de 24 pacientes, 4 foram excluídos por não atenderem as condições de análises. Dos 20 pacientes restantes, todos foram diagnosticados com LV com base na sintomatologia típica, incluindo a febre, anemia, perda de peso e hepatoesplenomegalia, além da detecção direta do parasita em aspirados de medula óssea (mielograma) e mielocultura. Dos 20 pacientes, 9 são do sexo masculino e 11 do sexo feminino, com faixa etária variável (0 à 75 anos). Os critérios para a classificação dos pacientes foram baseados em um estudo já estabelecido [57] em que um sistema de escores clínicos e laboratoriais, avalia o prognóstico e o risco de morte em pacientes com LV (Tabela 1) no momento do acesso ao hospital. Do total dos pacientes, 8 apresentaram LV com prognóstico grave (LVG) evoluindo com sangramentos e infecções bacterianas, mesmo com a terapia empregada (antimônios e anfotericina), e destes, 6 foram à óbito. Os demais pacientes (12), apresentaram LV não grave (LVNG), com prognóstico favorável, e todos foram submetidos à terapia para leishmaniose (antimônio ou anfotericina).

3.1 Delineamento dos transcritos gerados pelo RNA-Seq

Os RNAs isolados a partir de culturas axênicas de promastigotas de *L. infantum* das 24 amostras dos pacientes, foram sequenciados em modo rápido na plataforma do sistema Illumina HiSeq2500, gerando 354,4 milhões de reads com comprimento de leitura de 100 pb referente as 24 bibliotecas produzidas a partir das amostras (Tabela 2). A qualidade das reads foi analisada com o software fastQC utilizando como entrada os arquivos no formato fastq. Posteriormente foi feita a trimagem das reads, pelo software trimmomatic [58], baseada na qualidade das bases, cuja precisão da base chamada durante o sequenciamento é medida pelo índice (score) de qualidade de Phred (Q).

Os scores Q são definidos como uma propriedade logarítmica relacionada com a probabilidade de erro da base chamada. Um score (Phred) 30 (Q30) é equivalente à probabilidade de uma base incorreta ser chamada 1 em 1000 vezes. Isto é, a probabilidade de uma base chamada estar correta é de 99,9% [59]. O mapeamento das reads no genoma de referência (*L. infantum* JCPM5 versão 9.0 TritypDB) foi realizado pelo software TopHat (v. 2.0) [52] Os arquivos mapeados (BAM files) foram utilizados para montagem dos transcritos através da ferramenta Cufflinks [52] que produziu arquivos no formato GTF e estes foram “mesclados” gerando referência única através do Cuffmerge [52].

O cufflinks, também inclui a ferramenta Cuffdiff, que aceita as reads montada a partir de duas ou mais condições biológicas e analisa a sua expressão diferencial de genes e transcrições, auxiliando na investigação de sua transcrição e regulação pós-transcricional sob diferentes condições [54]. A abundância dos transcritos foi determinada pela ferramenta Cuffdiff, após normalização pela métrica do FPKM. De modo geral, 99,79% das reads foram mapeadas e descartados os transcritos com abundância menor que 40%. Em seguida foi determinada a análise da expressão diferencial entre os grupos grave e não grave, através desta ferramenta [52]. Foi aplicada a correção *False Discovery Rate* (FDR) visando corrigir os erros associados a múltiplos testes [55]. Para a seleção dos genes diferencialmente expressos, foram aceitos valores com $FDR \leq 10\%$. A ferramenta chamada CummeRbund (v. 2.7.2), foi utilizada para processar os arquivos de saída do Cuffdiff e dá uma saída de qualidade para a visualização dos dados (plots e figuras) [52,54].

Neste experimento, a quantidade de genes mapeados pelos transcritos foi de 8364 genes em relação ao genoma de referência que apresenta 8381 genes. Um total de 17 genes não foi mapeado. Para a montagem dos gráficos boxplot (Fig. 1 e 2) foi utilizado a biblioteca Bioconductor [60] do software estatístico R. O plot de densidade dos genes representado pela a distribuição dos valores do FPKM ($\text{Log}_{10}\text{fpkm}$) dos genes dos grupos grave e não grave mostrou uma uniformidade entre a distribuição desses genes (Fig. 3)

3.2 Análise de expressão diferencial entre os grupos grave e não grave.

A ferramenta Cufflinks utilizou os arquivos do mapeamento para montar as reads em transcritos e para estimar o nível de expressão, baseado em um índice denominado FPKM. Através da comparação destes índices entre as amostras dos grupos grave e não grave e por meio de testes estatísticos rigorosos determinou-se a expressão diferencial entre os grupos (Fig. 4). Estabelecendo um ponto de corte pela métrica do FPKM $\geq 1,5$ com um valor de FDR 10% que corrige o valor p para múltiplas hipóteses pelo método da taxa de falsas descoberta [55]. Os genes diferencialmente expressados foram definidos com um p -valor ajustado (p -value) $<0,05$ (5%). Esse valor de 5% já foi descrito como o valor capaz de descobrir verdadeiros positivos e minimizar os falsos positivos [61]. Foram produzidas duas tabelas (3 e 4) em que a tabela (3) foi gerada pela a classificação dos 50 genes mais expressos no grupo não grave e a tabela (4) pelos genes diferencialmente expressos no grupo grave. Foi verificado que a maioria dos genes expressos estão no grupo não grave. Considerando o critério do ponto de corte para o FPKM $\geq 1,5$ foi determinado que 50 genes foram regulados positivamente

(Upregulation /“up-regulados”+) no grupo não grave e apenas 3 genes foram regulados positivamente no grupo grave sendo regulados negativamente no grupo não grave (Downregulation /“down-regulados”-). A análise da expressão diferencial de genes em amastigotas (intracelular) *versus* promastigotas (Fig. 5 e 6) foi realizada baseado nas informações de experimentos de microarranjo [62] que avaliou a expressão diferencial individual de formas amastigotas intracelulares *versus* promastigotas da cepa *Leishmania infantum* JPCM5. Os dados de promastigotas também foram cruzados com informações de RNA-Seq da mesma *Leishmania* [63].

4. Discussão

O primeiro contato entre o parasita e o hospedeiro é dependente da interação entre as moléculas das células de ambos os organismos e o sucesso da infecção depende da capacidade do parasita de escapar dos mecanismos de proteção do hospedeiro, permitindo a proliferação e invasão nas células alvo [64]. Várias moléculas que estão associadas à virulência e interação parasito-hospedeiro são proteínas expressadas pelos genes, principalmente em função das condições do ambiente [65]. Neste trabalho avaliamos a expressão dos genes em promastigotas com o objetivo de identificar e caracterizar genes diferencialmente expressos que possam ser inferidos ou correlacionados com a gravidade da doença.

As reads geradas do sequenciamento produzem um arquivo com as reads-counts que é uma contagem simples da quantidade de RNA sequenciado nas amostras dos grupos grave e não grave, e o perfil da distribuição das read counts dos genes, que constituem o número de reads ou fragmentos provenientes do sequenciamento que se alinharam com um transcrito ou gene na amostra de referência [52], não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Fig. 1), o mesmo é verificado quando as read counts são mapeadas em genes (Fig. 2), gerando uma semelhança na distribuição das read counts. Um total de 8364 genes foram mapeados no genoma de referência que apresenta 8381 genes (*Leishmania infantum* JPCM5). Apenas 17 genes não foram mapeados, possivelmente devido a erros causados pela técnica.

A análise de expressão diferencial entre os grupos grave e não grave mostraram uma baixa correlação da expressão diferencial entre os genes (Fig. 4). Apenas 3 genes (Linj.28.29.50; Linj. 151240 e o Linj.23.rRNA1) foram identificados up-regulados no grupo grave. Por outro lado, no grupo não grave, houve uma maior expressão dos genes up-regulados. De modo geral, os grupos parecem expressar de maneira semelhante.

Recentemente um estudo foi desenvolvido para avaliar a influência do microambiente no transcriptoma de promastigotas de *Leishmania infantum*, proveniente do flebotomíneo e da cultura axênica. Neste estudo, foi verificado que o ambiente no qual o parasita se desenvolve interfere com a expressão de seus genes, tornando esses parasitas mais adaptáveis as novas condições [66]. Desse modo, é possível que as *Leishmanias*, apesar de virem de amostras de pacientes com condições de desfechos clínicos diferentes, grave e não grave, o ambiente de cultivo que mantém as mesmas condições de temperatura, pH e nutrientes, tenha promovido uma seleção de genes que melhor se adaptaram às condições do ambiente, e assim, proporcionando uma expressão de semelhança entre os genes dos grupos (grave e não grave). Também foi demonstrado que as características originais, infectividade e

virulência do parasita se tornam atenuados após inúmeras passagens em cultura, que pode ser remediado por passagens através de animais de laboratório [67].

Os genes diferencialmente expressos no grupo não grave, expressaram várias proteínas com funções diversas, no metabolismo lipídico, o aumento da regulação da esfingolipídio $\Delta 4$ -dessaturase (LinJ.26.1680) sugere um possível aumento da demanda de ácidos graxos no grupo. Foram identificados [67] em promastigotas metacíclicas provenientes do flebotomíneo uma upregulação significativa deste gene juntamente com o gene da proteína glicosilinositol: galactofuranose (GIPL-Galf) transferase, que participam na síntese de grandes quantidades de moléculas não glicosiladas inositolfosfoceramida (IPC) e GIPLs [68].

Interessantemente é que as GIPLs, fosfolipídios de glicosilinositol, constituem moléculas que revestem a superfície de promastigotas e amastigotas de *Leishmania* [69] e vários estudos *in vitro* em macrófagos murinos, mostraram que os GIPLs ajudam na sobrevivência destes parasitas dentro do macrófago por inibir a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na produção de NO, que é tóxico para esses parasitas [70,71]. Também foi demonstrado que os esfingolípídeos e as moléculas de sinalização derivada deles, desempenham um papel dinâmico que regula muitos processos biológicos, em vários organismos. Em particular, a via de sinalização dependente da proteína quinase C (PKC), além de participarem do transporte de membrana e remodelação do citoesqueleto, sendo importante para o estabelecimento da infecção pela *Leishmania* [72].

Dentro do processo metabólico lipídico também apresentou-se upregulado a enzima fosfoglicano beta 1,3 galactosiltransferase (LinJ.36.0010) muito embora a maioria dos genes membros da família desta proteína (enzima) são diferencialmente expressados em amastigotas [73]. A análise de expressão diferencial entre promastigotas procíclicas e metacíclicas de *L. infantum*, demonstrou que esta proteína, fosfoglicano beta 1,3 galactosiltransferase, bem como a amastina (LinJ.24.1300), ambas envolvidas nos processos de biossíntese de glicoproteína de superfície celular, são reguladas positivamente em promastigotas metacíclicas [74]. Este gene, amastina, também mostrou ser upregulado em amastigotas [75]. Uma análise de expressão com *L. major* e *L. infantum* demonstrou que algumas amastinas são estágio-específica do ciclo de vida destes parasitas, e que os perfis de expressão dos vários ortólogos são diferentes entre estas duas espécies [76].

Esses dois genes, amastina e 1,3-betagalactosil transferase estão relacionados com a infectividade das promastigotas metacíclicas, visto que é uma forma diferenciada do parasita que será exposta a resposta imune inata do hospedeiro mamífero e destina-se a entrar dentro

dos fagócitos [74]. Foi demonstrado, que alterações significativas entre as interações de membranas dos macrófagos e das amastigotas intracelulares, sugerem que as amastinas são fatores de virulência essenciais para a replicação do parasita no interior da célula hospedeira do mamífero [77].

A enzima β 1,3GalT também está envolvida na biossíntese de glicanos como LPG, PPG e glicoproteínas [78], estas moléculas estão envolvidas na infectividade e na virulência destes parasitas [79]. A arabinosiltransferase beta 1,2 fosfoglicano (LinJ.02.0190) também identificada, foi verificado sua participação em processos biológicos e função molecular semelhante a enzima β 1,3GalT. Já a beta frutofuranosidase (LinJ.04.0300) representa uma enzima importante nos processos metabólicos dos carboidratos promovendo a formação de moléculas derivadas de carboidratos a partir da adição de uma molécula de carboidrato.

Um gene interessante que foi identificado como upregulado foi (LinJ.15.0540) de uma suposta ecotina (ISP3), esse gene participa do mecanismo ativo de evasão da resposta imune do hospedeiro através da regulação do sistema complemento do hospedeiro. Em *L. major* três genes semelhantes a ecotina, denominados inibidores da serina peptidase (ISP) foram identificados (ISP1/ISP2/ISP3) e são expressos em promastigotas procíclicos e metacíclico [80]. A inibição das serino peptidases pelos ISP no estágio inicial da interação parasita-macrófago nas células do hospedeiro mamífero é requerido para uma adaptação intracelular inicial ótima pela *L. major* nos macrófagos, sendo crucial para o estabelecimento de infecções produtivas no hospedeiro [81]

Entre os processos de modificação protéica, a atividade da proteína quinase (PK) está presente em níveis elevados em promastigotas de fase logarítmica e estacionária [62]. A proteína kinase (LinJ.30.0620) também foi identificada como upregulada em promastigotas metacíclicas em relação as promastigotas procíclicas por [74]. Estas proteínas estão associadas a várias vias de transdução de sinais, muito embora, ainda não são descritas em *Leishmania spp.* e a atividade da PK aparece em um amplo espectro de famílias de proteínas. Assim, a regulação específica do estágio de abundância da transcrição pode ser diferente, dependendo da PK específicas [74].

Vários genes que codificam o fator de alongamento α , inclusive o (LinJ.17.0190), que foi identificado neste estudo, foi upregulado nos resultados de [74]. Esta proteína tem sido implicada na interferência com vias de transdução de sinais, mediados pelo sistema SHP-1 em macrófagos e por modular resposta na célula [34].

As atividades relacionadas à expressão de genes também indicaram que os processos biológicos relacionados à tradução e biogênese ribossomal são altamente representados nas promastigotas de fase estacionária (metacíclicas). Proteínas relacionadas ao processo de tradução, como a ubiquitina de fusão (LinJ.31.1930) foram encontradas upreguladas em promastigotas metacíclicas e proteínas de reparação do emparelhamento incorreto de bases do DNA também foram identificadas (LinJ.21.1100). Essas proteínas foram demonstradas upreguladas em promastigotas de *L. infantum*, provenientes do flebotomíneo, em relação à forma amastigota [67]. Elas compõem um sistema de reconhecimento e reparação da inserção errada, deleção, e da incorporação errada de bases que podem surgir durante a replicação do DNA e nos processos de recombinação [82].

Proteínas responsáveis pela montagem e desmontagem da cromatina, ou seja, proteínas envolvidas nos processos que evitam ou reduzem a frequência, o grau e a extensão do silenciamento da cromatina, (LinJ.20.0060) juntamente com várias proteínas de ligação ao RNA, (LinJ.29.1440, LinJ.29.1460, LinJ.29.1470) foram identificadas upreguladas. As proteínas de ligação ao RNA, são proteínas que se ligam as moléculas do ácido ribonucleico (RNA), geralmente são encontradas no citoplasma e no núcleo, e são importantes na formação de ribonucleoproteínas (RNPs) que sinalizam os eventos do splicing de mRNA (RNA mensageiro), poliadenilação, estabilização, localização e tradução [83]. Pequenos RNAs nucleares (snRNAs) (LinJ.23.snRNA2), que se associam no núcleo com precursores dos mRNA e rRNA (pré-mRNA e pré-rRNA) sob a forma de ribonucleoproteína (snRNP), e pequenos RNAs nucleolares (LinJ.05.snoRNA1) [84,85].

A proteína semelhante ao fator de interação a um domínio nuclear LIM, (LinJ.36.7090) são proteínas de ligações que constitui fatores de transcrição capazes de modificar destinos celulares durante o desenvolvimento das células, resultando em diversos tipos de células diferenciadas capazes de funções únicas, como a atividade de marcação para a degradação e dobramento de proteínas chaperonas. Nos processos de dobramentos protéicos as chaperoninas HSP 60 foram identificadas (LinJ.36.2140, LinJ.36.2130) e implicadas na importação de proteína mitocondrial e montagem macromolecular, além de facilitar o dobramento correto de proteínas importadas. A análise da expressão diferencial de proteínas, também identificou estas proteínas em *L. infantum* em uma relação upregulada entre amastigota e promastigotas [45].

A proteína calreticulina (LinJ.31.2670), envolvida nos dobramentos protéicos e na montagem correta de polipeptídeos de cadeia simples ou complexas, foi identificada upregulada e também apresenta a função molecular como ligante de íons cálcio.

A ubiquitina é uma proteína muito conservada envolvida em uma variedade de funções celulares como na seleção protéica para a degradação e resistência ao estresse [86]. Foi verificado que a variação na ligação da ubiquitina pode influenciar a função da proteína à proteólise atuando na modificação protéica como uma chaperona. Vários genes da ubiquitina foram encontrados por [87] em diferentes fases do ciclo do parasita *L. infantum*. Esta proteína (LinJ.31.1930) também foi encontrada upregulada neste estudo.

Genes upregulados das citocromos oxidases foram identificados (LinJ.12.0620, LinJ.07.0210, LinJ.20.0850) neste trabalho. As funções destes genes foram relacionadas ao gene que codifica uma proteína de 27 kDa (Ldp27), presente na membrana mitocondrial da *L. donovani*. A proteína Ldp27 está associada à subunidade do complexo ativo da COX (Citocromo oxidase), específica nas fases infecciosas de promastigotas metacíclicas e amastigotas de *Leishmania*. Foi demonstrado que Ldp27 é necessária para elevar o nível de atividade da COX nas amastigotas e que a supressão deste gene reduz a atividade da COX e a síntese de ATP nestes parasitas, tornando-os menos virulentos na infecção [88].

Outros genes upregulados identificados foram os das proteínas Rieske (LinJ.35.1540), que são proteínas ferro-enxofre componentes de complexos das citocromos oxidases, os genes de uma suposta subunidade (F1) das proteínas ATP sintases (LinJ.21.2140) que são acopladas ao transporte de prótons e vários outros genes relacionados aos processos celulares metabólicos (LinJ.35.1240, LinJ.17.1110), à comunicação celular (LinJ.25.1210, LinJ.21.0820) e ao ciclo celular (LinJ.30.3690). Além disso, um total de 19 genes que codificam proteínas hipotéticas distintas foram upregulados, porém nenhuma suposta função biológica foi avaliada nesses genes.

Em relação ao grupo grave, apenas 3 genes foram identificados como up-regulados e anotados como: Proteína de choque térmico Hsp70 (LinJ.28.2950), Transportador de nucleosídeo 1 (LinJ.15.1240) e rRNA 5S(MS) (LinJ.23.rRNA1).

A proteína de choque térmico Hsp70 exibe funções de chaperonas auxiliando nos dobramentos protéicos, montagens de proteínas complexas e nas translocações de proteínas através dos compartimentos celulares [89,90]. Na *L. donovani* a HSP70 foi caracterizada como um antígeno dominante, alvo da resposta imune humoral nas infecções [91].

Na *L. infantum*, também foi demonstrado que as proteínas HSP70 e HSP83 se comportam como potentes mitógenos *in vitro* para as células B dos esplenócitos murinos [92]. Vários trabalhos apontam esta proteína como um fator de virulência [93,94]. Em *T. gondii* foi demonstrado que a Hsp70 inibe a expressão da iNOS, a produção de NO, e a atividade do NF- κ B. Esses efeitos foram observados nas cepas virulentas destes parasitas [95]. O transportador de nucleosídeo 1 é um componente celular de membrana cujo processo biológico e função molecular consiste em transportar nucleosídeos através da atividade transmembranar.

Uma análise bastante interessante, foi realizada entre os genes diferencialmente expressos identificados neste estudo com os genes diferencialmente expressos em amastigotas (intracelular) (Fig. 5 e 6), cuja expressão não foi modificada pelo estágio do ciclo celular. De acordo com o resultado da análise é possível sugerir que os genes upregulados presentes em ambas as formas, promastigotas e amastigotas, tenham correlações a fim de validar as observações feitas em promastigotas de maneira que possa se estender na compreensão do que ocorre no hospedeiro vertebrado.

Apesar do perfil de expressão diferencial ter identificado poucos genes, entre os grupos grave e não grave, como o gene Hsp 70 e o gene transportador de nucleosídeo que foram fortemente expressos apenas no grupo grave, as condições de cultivo foram apropriadas para a expressão de todos os outros genes, muitos deles, associados a fatores de virulência e importantes na efetividade da infecção do parasita. Desse modo, sugerindo possíveis alvos para pesquisas futuras e geração de meios para o desenvolvimento de estratégias que possam intervir no processo infeccioso e auxiliar no controle e erradicação desta doença.

5. Conclusão

Neste trabalho foram identificados e anotados genes upregulados expressados tanto no grupo grave (3 genes) quanto no grupo não grave (50 genes) que são sugestivos de virulência e importantes na infectividade. Dentre os genes identificados no grupo grave a proteína Hsp70 e um transportador de nucleosídeo se destacaram com maior expressão e não foram expressos no grupo não grave. A baixa expressão diferencial entre os grupos grave e não grave possivelmente foi devido à seleção do meio de cultura sobre os grupos de parasitas igualando a expressão dos seus genes. Os genes gerados neste trabalho podem ser apontados como possíveis alvos para pesquisas futuras gerando meios para o desenvolvimento de estratégias que intervenham no processo infeccioso e auxiliem no controle e erradicação desta doença.

Conflitos de interesses:

Os autores declaram que não há conflitos de interesses.

Contribuições dos autores:

Concepção e desenho dos experimentos: VCSO VCS CHNC

Realização dos experimentos: VCSO

Análise dos dados: VCSO VCS CHNC VQB SSLPJ RMF

Contribuição com: reagentes / materiais / ferramentas de análise: CHNC VCS VCS VQB
SSLPJ RMF

Escreveu o paper /artigo: VCSO VCS CHNC

Agradecimentos:

Somos gratos ao IDTNP (Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela - PI) por nos permitir o desenvolvimento deste projeto nos fornecendo materiais para a realização deste trabalho. Ao LaCTAD (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho - UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas – SP) pela realização do seqüenciamento e análise de bioinformática. Ao LABBE (Laboratório de Bioinformática e de Biologia Evolutiva) pela contribuição no processamento e análises de bioinformática. Ao técnico Alexandre Silva por sua presteza no cultivo e criopreservação dos parasitas.

Referências

1. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2009;136:1915.
2. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin J-C, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect. Genet. Evol.* 2010;10:238–45.
3. Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;104:9375–80.
4. Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles M a. Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* 2007;37:565–76.
5. Zemanová E, Jirků M, Mauricio IL, Horák A, Miles M a., Lukeš J. The *Leishmania donovani* complex: Genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. *Int. J. Parasitol.* 2007;37:149–60.
6. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008;2:e313.
7. Reithinger R. Leishmaniasis' burden of disease: Ways forward for getting from speculation to reality. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008;2:1–4.
8. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control OF Leishmaniasis. GENEVA. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 2010;185.
9. Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005;100:811–27.
10. Maia-Elkhoury ANS, Alves W a, Sousa-Gomes ML De, Sena JM De, Luna E a. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saude Publica.* 2008;24:2941–7.
11. Harhay MO, Olliaro PL, Vaillant M, Chappuis F, Lima MA, Ritmeijer K, et al. Who Is a Typical Patient with Visceral Leishmaniasis? Characterizing the Demographic and Nutritional Profile of Patients in Brazil, East Africa, and South Asia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011;84:543–50.
12. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide

and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012. p. e35671.

13. Werneck GL, Costa CHN, de Carvalho FAA, Pires e Cruz MDS, Maguire JH, Castro MC. Effectiveness of Insecticide Spraying and Culling of Dogs on the Incidence of *Leishmania infantum* Infection in Humans: A Cluster Randomized Trial in Teresina, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014;8:e3172.

14. Grech V, Mizzi J, Mangion M, Vella C. Visceral leishmaniasis in Malta--an 18 year paediatric, population based study. *Arch. Dis. Child.* 2000;82:381–5.

15. Badaro R, Jones TC, Lorengo R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A Prospective Study of Visceral Leishmaniasis in an Endemic Area of Brazil. *J. Infect. Dis.* 1986;154:639–49.

16. Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Barros Vasconcelos I d. A, Vasconcelos AW, de Queiroz Sousa A, et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Northeast Brazil. *J. Infect. Dis.* 1992;166:1124–32.

17. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999;354:1191–9.

18. Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipngetich S, et al. Conflict and Kala-azar: Determinants of Adverse Outcomes of Kala-azar among Patients in Southern Sudan. *Clin. Infect. Dis.* 2004;38:612–9.

19. Costa CHN, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2010;43:386–92.

20. Costa DL, Rocha RL, Carvalho RM a, Lima-Neto AS, Harhay MO, Costa CHN, et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog. Glob. Health.* 2013;107:78–87.

21. Silva JM, Zacarias D a., De Figueirêdo LC, Soares MR a, Ishikawa E a Y, Costa DL, et al. Bone marrow parasite burden among patients with new world kala-azar is associated with disease severity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014;90:621–6.

22. Kedzierski L, Evans KJ. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2014;141:1544–62.

23. Kurkjian KM, Mahmutovic AJ, Kellar KL, Haque R, Bern C, Secor WE. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. *Cytom. Part A.* 2006;69A:353–8.

24. Costa ASA, Costa GC, Aquino DMC de, Mendonça VRR de, Barral A, Barral-Netto M, et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between

- the clinical forms of visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2012;107:735–9.
25. Miralles GD, Stoeckle MY, Mcdermott DF, Finkelman FD, Murray HW. Th1 and Th2 Cell-Associated Cytokines in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Infect. Immun.* 1994;62:1058–63.
 26. Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Front. Immunol.* 2012;3:1–10.
 27. Khadem F, Uzonna JE. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. *Future Microbiol.* 2014;9:901–15.
 28. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to leishmania major in mice. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2:845–58.
 29. Gregory DJ, Olivier M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology.* 2005;130:S27.
 30. Olivier M, Gregory DJ. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005;18:293–305.
 31. Kavooosi G, Ardestani SK, Kariminia A, Abolhassani M, Turco SJ. *Leishmania major*: Reactive oxygen species and interferon gamma induction by soluble lipophosphoglycan of stationary phase promastigotes. *Exp. Parasitol.* 2006;114:323–8.
 32. Nandan D. *Leishmania* EF-1 α Activates the Src Homology 2 Domain Containing Tyrosine Phosphatase SHP-1 Leading to Macrophage Deactivation. *J. Biol. Chem.* 2002;277:50190–7.
 33. Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol.* 2008;9:R35.
 34. Lambertz U, Silverman JM, Nandan D, McMaster WR, Clos J, Foster LJ, et al. Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis. *J. Leukoc. Biol.* 2012;91:887–99.
 35. Zilberstein D, Shapira M. The Role of pH and Temperature in the Development of *Leishmania* Parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 1994;48:449–70.
 36. Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 1996;22:1–13.
 37. Pace D. Leishmaniasis. *J. Infect.* 2014;69:S10–8.
 38. Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun.* 1999;67:3703–13.

39. Casadevall A, Pirofski L. Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. *J. Infect. Dis.* 2001;184:337–44.
40. Jansen A, Yu J. Differential gene expression of pathogens inside infected hosts. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006;9:138–42.
41. Duncan R, Salotra P, Goyal N, Akopyants N, Beverley S, Nakhasi H. The Application of Gene Expression Microarray Technology to Kinetoplastid Research. *Curr. Mol. Med.* 2004;4:611–21.
42. Akopyants NS, Matlib RS, Bukanova EN, Smeds MR, Brownstein BH, Stormo GD, et al. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2004;136:71–86.
43. Holzer TR, McMaster WR, Forney JD. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006;146:198–218.
44. McNicoll F, Drummelsmith J, Müller M, Madore É, Boilard N, Ouellette M, et al. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics.* 2006;6:3567–81.
45. Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2007;152:35–46.
46. Ouakad M, Bahi-Jaber N, Chenik M, Dellagi K, Louzir H. Selection of endogenous reference genes for gene expression analysis in *Leishmania major* developmental stages. *Parasitol. Res.* 2007;101:473–7.
47. Saxena a., Lahav T, Holland N, Aggarwal G, Anupama A, Huang Y, et al. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2007;152:53–65.
48. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10:57–63.
49. Rastrojo A, Carrasco-Ramiro F, Martín D, Crespillo A, Reguera RM, Aguado B, et al. The transcriptome of *Leishmania major* in the axenic promastigote stage: transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. *BMC Genomics.* 2013;14:223.

50. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmania Visceral: Recomendações clínicas para redução da letalidade. Série A. N. Ministério da Saúde, editor. Brasília - DF: Ministério da Saúde; 2011.
51. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1st ed. Ministério da Saúde, editor. Ministério da Saúde. Brasília - DF: Ministério da Saúde; 2006.
52. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* 2012;7:562–78.
53. Roberts A, Pimentel H, Trapnell C, Pachter L. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq. *Bioinformatics.* 2011;27:2325–9.
54. Ghosh S, Chan C-KK. Analysis of RNA-Seq Data Using TopHat and Cufflinks. *Methods Mol. Biol.* 2016;1374:339–61.
55. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc.* 1995. p. 289–300.
56. Gene Ontology Consortium | Gene Ontology Consortium [Internet]. [cited 2016 Mar 26]. Available from: <http://geneontology.org/>
57. Costa DL, Rocha RL. Fatores de Prognóstico na Leishmaniose visceral: Alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune, aos distúrbios da coagulação e à morte. Programa Pós-Graduação em Ciências da Saúde Infectol. e Med. Trop. da Univ. Fed. Minas Gerais. 2009.
58. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30:2114–20.
59. Illumina. Quality Scores for Next-Generation Sequencing. Http://Res.Illumina.Com/Documents/Products/Technotes/Technote_Q-Scores.Pdf. 2011;1–2.
60. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2009;26:139–40.
61. Zhang ZH, Jhaveri DJ, Marshall VM, Bauer DC, Edson J, Narayanan RK, et al. A Comparative Study of Techniques for Differential Expression Analysis on RNA-Seq Data. *PLoS One.* 2014;9:e103207.
62. Lahav T, Sivam D, Volpin H, Ronen M, Tsigankov P, Green a, et al. Multiple levels of gene regulation mediate differentiation of the intracellular pathogen *Leishmania*. *FASEB J.*

2011;25:515–25.

63. Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates P a, Depledge DP, et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res.* 2011;21:2129–42.

64. da Fonseca Pires S, Fialho LC, Silva SO, Melo MN, de Souza CC, Tafuri WL, et al. Identification of Virulence Factors in *Leishmania infantum* Strains by a Proteomic Approach. *J. Proteome Res.* 2014;13:1860–72.

65. Depledge DP, Evans KJ, Ivens AC, Aziz N, Maroof A, Kaye PM, et al. Comparative Expression Profiling of *Leishmania*: Modulation in Gene Expression between Species and in Different Host Genetic Backgrounds. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009;3:e476.

66. Alcolea PJ, Alonso A, Domínguez M, Parro V, Jiménez M, Molina R, et al. Influence of the Microenvironment in the Transcriptome of *Leishmania infantum* Promastigotes: Sand Fly versus Culture. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10:e0004693.

67. Alcolea PJ, Alonso A, Gómez MJ, Postigo M, Molina R, Jiménez M, et al. Stage-specific differential gene expression in *Leishmania infantum*: from the foregut of *Phlebotomus perniciosus* to the human phagocyte. *BMC Genomics.* 2014;15:849.

68. Zhang K, Barron T, Turco SJ, Beverley SM. The LPG1 gene family of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2004;136:11–23.

69. Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1999;1455:341–52.

70. Chawla M, Vishwakarma R a. Alkylacylglycerolipid domain of GPI molecules of *Leishmania* is responsible for inhibition of PKC-mediated c-fos expression. *J. Lipid Res.* 2003;44:594–600.

71. Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, Turco SJ, Soares RP. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6:1–11.

72. Machado de Assis TS, Rabello A, Werneck GL. Predictive models for the diagnostic of human visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6:1–7.

73. Rochette A, Raymond F, Ubeda J-M, Smith M, Messier N, Boisvert S, et al. Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. *BMC Genomics.* 2008;9:255.

74. Alcolea PJ, Alonso A, Sánchez-Gorostiaga A, Moreno-Paz M, Gómez MJ, Ramos I, et al.

- Genome-wide analysis reveals increased levels of transcripts related with infectivity in peanut lectin non-agglutinated promastigotes of *Leishmania infantum*. *Genomics*. 2009;93:551–64.
75. Rochette A, Raymond F, Corbeil J, Ouellette M, Papadopoulou B. Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2009;165:32–47.
76. Rochette A, McNicoll F, Girard J, Breton M, Leblanc É, Bergeron MG, et al. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. *Mol. Biochem. Parasitol.* [Internet]. 2005;140:205–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166685105000241>
77. de Paiva RMC, Grazielle-Silva V, Cardoso MS, Nakagaki BN, Mendonça-Neto RP, Canavaci AMC, et al. Amastin Knockdown in *Leishmania braziliensis* Affects Parasite-Macrophage Interaction and Results in Impaired Viability of Intracellular Amastigotes. *PLoS Pathog.* [Internet]. 2015;11:1–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005296>
78. Naderer T, Vince JE, McConville MJ. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr. Mol. Med.* 2004;4:649–65.
79. Ilgs T, Overaths P, Fergusonon MAJ, Rutherford T, Campbell DG, Mcconville MJ. O- and N-Glycosylation of the *Leishmania mexicana*-secreted Acid Phosphatase. Characterization of a new class of phosphoserine-linked glycans. *Biochemistry*. 1994;269:24073–81.
80. Besteiro S, Coombs GH, Mottram JC. A potential role for ICP, a leishmanial inhibitor of cysteine peptidases, in the interaction between host and parasite. *Mol. Microbiol.* 2004;54:1224–36.
81. Eschenlauer SCP, Faria MS, Morrison LS, Bland N, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, et al. Influence of parasite encoded inhibitors of serine peptidases in early infection of macrophages with *Leishmania major*. *Cell. Microbiol.* 2009;11:106–20.
82. Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. *Chem. Rev.* 2006;106:302–23.
83. Frye M, Jaffrey SR, Pan T, Rechavi G, Suzuki T. RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nat. Rev. Genet.* 2016;17:365–72.
84. Hughes JM, Konings DA, Cesareni G. The yeast homologue of U3 snRNA. *EMBO J.* 1987;6:2145–55.
85. Tollervey D, Kiss T. Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997;9:337–42.

86. Graeff GR, Steele PM, Peterson CL, Bennett ML, Langer PJ. Sequence of a *Leishmania* major gene encoding an ubiquitin fusion protein. *Gene*. 1993;131:155–6.
87. Alcolea PJ, Alonso A, Gomez MJ, Sanchez-Gorostiaga A, Moreno-Paz M, Gonzalez-Pastor E, et al. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. *BMC Genomics*. 2010;11:31.
88. Dey R, Meneses C, Salotra P, Kamhawi S, Nakhasi HL, Duncan R. Characterization of a *Leishmania* stage-specific mitochondrial membrane protein that enhances the activity of cytochrome c oxidase and its role in virulence. *Mol. Microbiol.* 2010;77:399–414.
89. Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, Suto R, Jaikaria NS, Basu S, et al. Heat Shock Protein-Peptide Complexes, Reconstituted In Vitro, Elicit Peptide-specific Cytotoxic T Lymphocyte Response and Tumor Immunity. *J. Exp. Med.* 1997;186:1315–22.
90. Rafati S, Gholami E, Hassani N, Ghaemimanesh F, Taslimi Y, Taheri T, et al. *Leishmania* major heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. *Vaccine*. 2007;25:4159–69.
91. MacFarlane J, Blaxter ML, Bishop RP, Miles M a., Kelly JM. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. *Eur. J. Biochem.* 1990;190:377–84.
92. Rico AI, Gironès N, Fresno M, Alonso C, Requena JM. The heat shock proteins, Hsp70 and Hsp83, of *Leishmania infantum* are mitogens for mouse B cells. *Cell Stress Chaperones*. 2002;7:339–46.
93. Adhuna A, Saltora P, Bhatnagar R. Nitric oxide induced expression of stress proteins in virulent and avirulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Immunol. Lett.* 2000;71:171–6.
94. Salotra P, Ralhan R, Sreenivas G. Heat-stress induced modulation of protein phosphorylation in virulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000;32:309–16.
95. Dobbin CA, Smith NC, Johnson AM. Heat Shock Protein 70 Is a Potential Virulence Factor in Murine *Toxoplasma* Infection Via Immunomodulation of Host NF- B and Nitric Oxide. *J. Immunol.* 2002;169:958–65.

Tabela 1. Classificação dos pacientes com leishmaniose visceral

Nº Mielograma	Escore de gravidade	Probabilidade de morte (%)	Classificação quanto a gravidade	Classificação quanto a sobrevivência
4092	0	0.003	Não grave	Vivo
3557	0	0.003	Não grave	Vivo
3991	0	0.005	Não grave	Vivo
4018	1	0.01	Não grave	Vivo
4084	1	0.07	Não grave	Vivo
3907	2	0.02	Não grave	Vivo
5556	2	0.02	Não grave	Vivo
5550	2	0.02	Não grave	Vivo
5560	2	0.03	Não grave	Vivo
4118	2	0.03	Não grave	Vivo
4090	3	0.04	Não grave	Vivo
4611	4	0.08	Não grave	Vivo
5181	4	0.13	grave	Vivo
4068	4	0.13	grave	Morto
5570	5	0.15	grave	Morto
2855	5	0.25	grave	Morto
3075	6	0.29	grave	Vivo
3967	6	0.29	grave	Morto
3845	6	0.44	grave	Morto
3800	8	0.67	grave	Morto

Tabela 2. Número de reads gerados por amostra.

Amostra	Reads	% Bases > = Q30
4092	4.587.448	85,60
3557	16.316.948	86,38
3991	11.130.710	86,27
4018	24.616.850	86,55
3189	17.297.836	86,44
4084	14.418.620	84,95
3907	8.874.170	86,79
5556	11.871.690	85,83
5550	38.585.330	85,14
5560	5.883.218	86,91
4118	16.496.116	86,57
2914	14.341.694	84,67
4090	20.218.152	85,95
4611	6.786.684	86,12
5181	11.363.926	87,08
4068	11.291.534	85,89
5570	17.196.394	86,39
2855	14.443.334	86,18
3075	14.849.854	86,47
3967	14.112.170	86,92
3845	8.035.532	86,24
3916	23.383.798	86,36
3800	11.743.080	86,21
3816	16.547.766	87,11

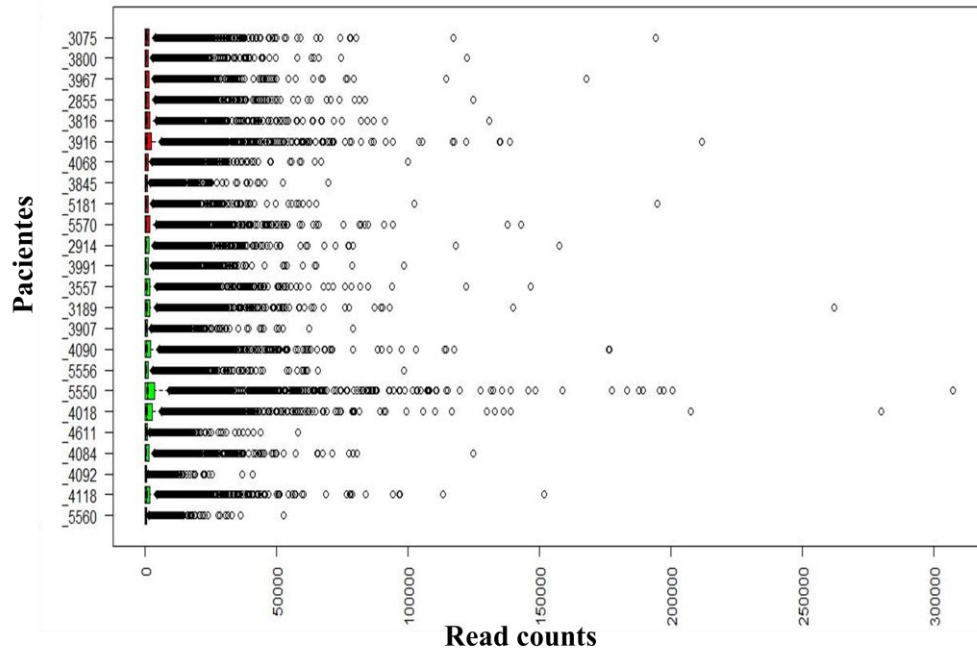


Figura 1. BoxPlot representando o total de reads counts por amostra. As caixas vermelhas representam os pacientes graves e as verde os não graves.

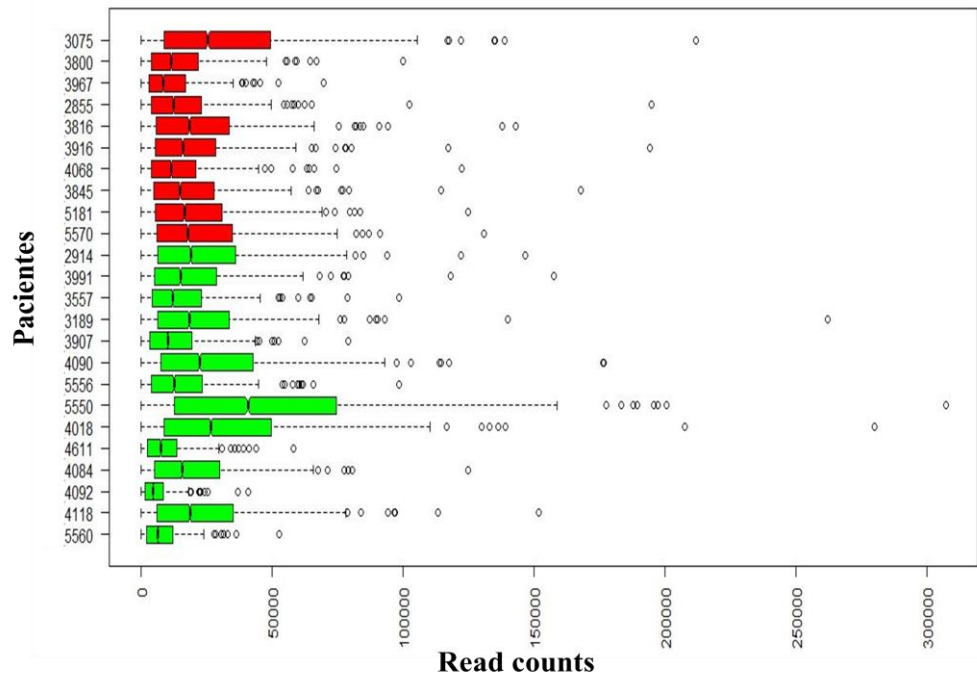


Figura 2. BoxPlot representando os reads mapeados nos genes de cada amostra. As caixas vermelhas representam os pacientes graves e as verde os não graves.

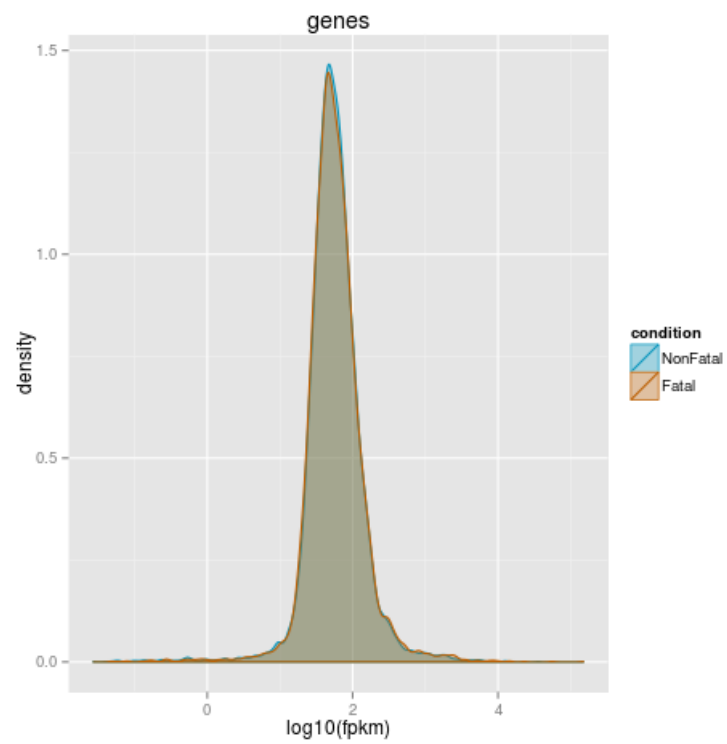


Figura 3. Plot de densidade representando a distribuição dos valores do FPKM ($\text{Log}_{10}\text{fpkm}$) dos genes dos grupos grave e não grave para avaliar ou examinar a quantidade de genes no conjunto total dos genes.

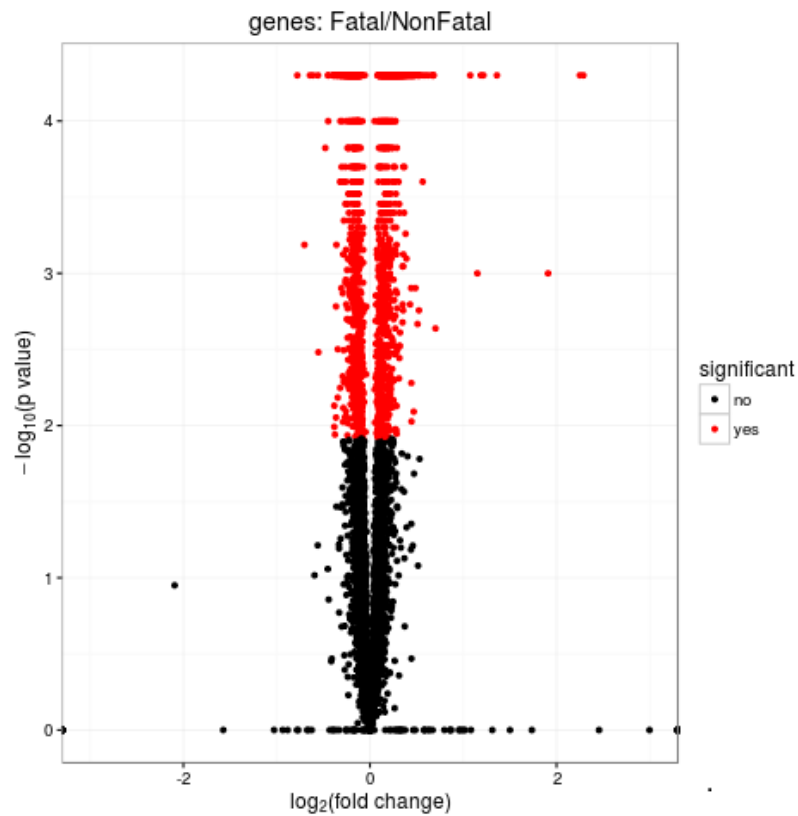


Figura 4. Volcano Plot. Gráfico de dispersão da expressão diferencial dos genes dos grupos grave x não grave. Cada ponto representa um gene sendo que os vermelhos são os significativamente expressos e a linha cinza que demarca no eixo x para $\log_2\text{Fc}$ (logaritmo de *fold-change*) é o ponto em que o nível de expressão é maior que duas vezes. $-\log_{10}(p \text{ value})$ versus $\log_2\text{Fc}$. Considera-se um gene diferencialmente expresso para $\log_2\text{Fc} > 2$.

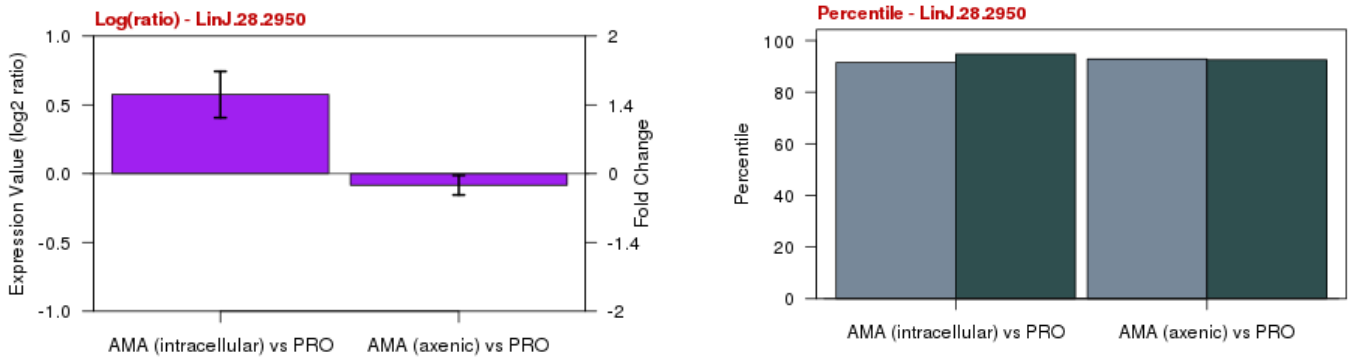


Figura 5. Descrição da diferença de expressão do gene da proteína de choque térmico (HSP70) usando Fold Change ($FC < -2$) ou ($FC \geq 2$) como cutoff. Eixo X Comparação direta; Amastigotas Intracelulares vs. Promastigotas (IC.A vs P) e Amastigotas axênicas vs. promastigotas (Ax.A vs P). Eixo Y Valores de expressão para experimentos de microarranjos de 2 canais são razões de log ($M = \log_2 Cy5 / Cy3$). Foi fornecido a diferença no eixo direito. Para quaisquer 2 pontos no gráfico (M1, M2) a diferença em vezes é calculado por: alimentação (2, (M2-M1)) ou valor da expressão percentil.

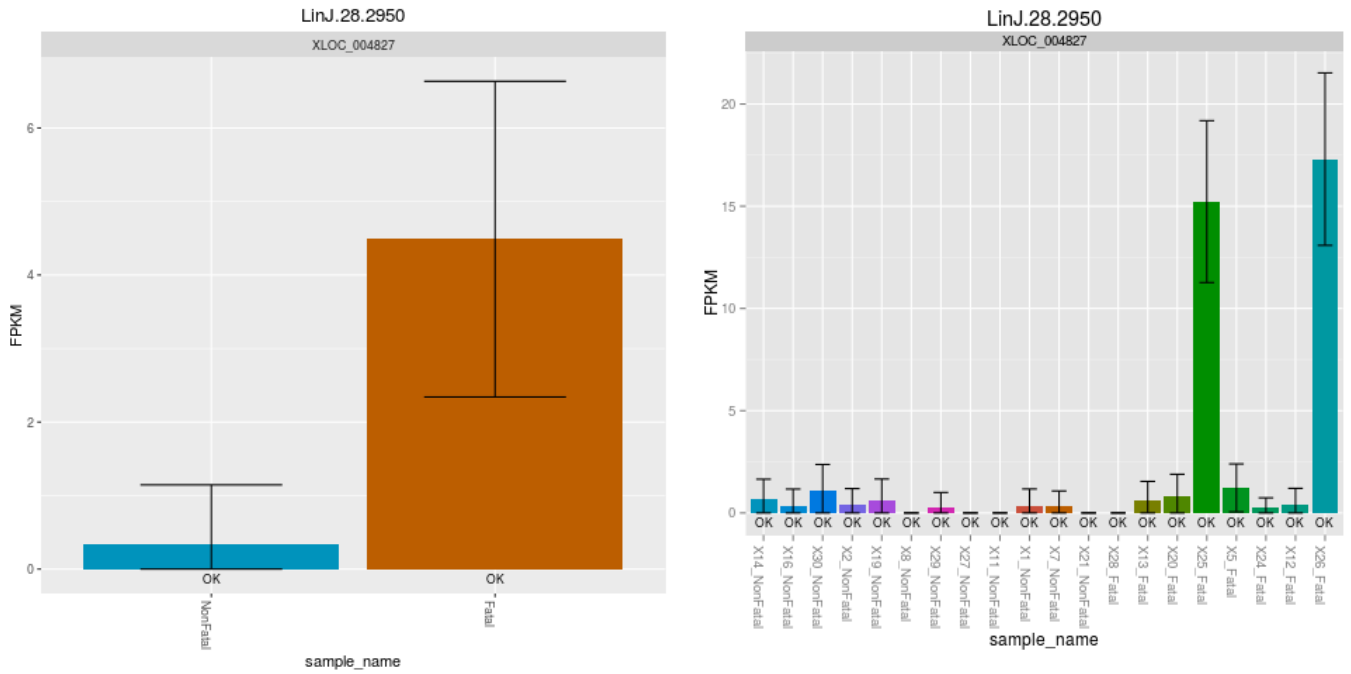


Figura 6. Medida de expressão diferencial do gene da (HSP70) entre grupos (grave vs não grave) e entre amostras. Normalização por FPKM e diferenciação por Fold Change ($FC < -1,5$) ou ($FC \geq 1,5$).

Tabela 3. Os 50 genes diferencialmente expressos no grupo não grave em relação ao grupo grave (FC ≥ 1,5)

Anotação	Função do gene anotado	FC	RC GG	RC GNG	p value	FDR	FPKM GNG	IC GNG	FPKM GG	IC GG	R (+/-)	Ai/P
LinJ.23.0700	Hypotheticalprotein	115.486.453.202	3248	3751	5,00E-05	0.000500685	249.176	220.415 - 277.937	395.975	359.807 - 432.144	+	--
LinJ.23.snRNA2	Small nuclear RNA U3 snRNA	115.555.555.556	45	52	0.001	0.00676852	156.904	6.87616 - 306.932	348.644	130.314 - 566.975	+	P
LinJ.36.2140	Chaperonin HSP60 mitochondrial precursor	116.907.248.157	6512	7613	5,00E-05	0.000500685	245.343	228.448 - 262.238	393.35	372.061 - 414.639	+	=
LinJ.36.2130	Chaperonin HSP60 Mitochondrial precursor	120.228.003.508	3421	4113	5,00E-05	0.000500685	134.968	122.518 - 147.419	203.815	188.589 - 219.041	+	=/dr
LinJ.12.0620	Cytochrome c oxidase subunit IV	120.362.190.813	4528	5450	5,00E-05	0.000500685	265.08	241.741 - 288.418	409.472	380.602 - 438.342	+	=/+Ai/dr
LinJ.08.1190	Hypotheticalproteinconserved	120.919.881.306	3370	4075	5,00E-05	0.000500685	403.794	329.424 - 478.165	597.122	506.208 - 688.036	+	--
LinJ.36.7090	Nuclear lim interactor interacting Factor putative	121.568.627.451	204	248	0.00125	0.00810585	148.196	8.74184 - 20.8974	201.327	13.0128 - 27.2526	+	=/Ai+
LinJ.30.3690	CYC2-like protein putative (CYC7)	125.161.290.323	155	194	0.00025	0.00211161	114.451	5.49777 - 17.3924	169.332	9.83231 - 24.034	+	=/P/ur
LinJ.17.0190	Elongationfactor 1-alpha	12.542.204.568	1007	1263	5,00E-05	0.000500685	817.816	70.5994 - 92.9638	107.875	95.1414 - 120.609	+	=/ur
LinJ.36.0790	Hypotheticalproteinconserved	126.358.695.652	368	465	5,00E-05	0.000500685	156.522	11.1005 - 20.204	213.171	15.9502 - 26.684	+	--
LinJ.15.0540	Ecotinputative ISP3)	126.564.673.157	719	910	5,00E-05	0.000500685	41.547	32.7463 - 50.3478	534.769	43.5696 - 63.3842	+	=
LinJ.21.1100	mis-match repair protein putative	127.601.809.955	884	1128	5,00E-05	0.000500685	135.188	11.2277 - 15.8099	193.788	16.6111 - 22.1465	+	=
LinJ.32.2610	Hypotheticaproteinconserved	127.697.841.727	556	710	5,00E-05	0.000500685	136.648	10.6959 - 16.6337	190.534	15.5643 - 22.5425	+	--
LinJ.05.snoRNA1	LM5C1C4	127.777.777.778	126	161	0.0023	0.0131445	33.676	6.47277 - 60.8793	547.922	21.708 - 87.8765	+	P
LinJ.35.5040	Hypotheticalproteinconserved	127.777.777.778	162	207	0.00125	0.00810585	116.178	6.05814 - 17.1775	162.906	9.75465 - 22.8265	+	--
LinJ.06.1360	Hypotheticalproteinconserved	127.967.479.675	6150	7870	5,00E-05	0.000500685	218.634	203.73 - 233.539	298.096	280.854 - 315.337	+	--
LinJ.30.0620	Proteinkinaseputative	128.298.611.111	576	739	5,00E-05	0.000500685	144.304	11.3046 - 17.5562	198.413	16.1915 - 23.491	+	=
LinJ.20.1420	Pumilio protein 9 putative RNA-binding Regulatory protein putative (PUF9B)	128.571.428.571	357	459	0.02065	0.0754415	812.685	4.98307 - 11.2706	986.745	6.35558 - 13.3793	+	P/ur
LinJ.20.0060	anti-silencing protein asf 1-like protein	129.180.327.869	305	394	0.0009	0.0061801	484.732	31.3383 - 65.6081	620.317	43.0566 - 81.0069	+	=/P/dr
LinJ.04.0300	beta-fructofuranosidaseputative	129.692.832.765	586	760	0.0005	0.00382177	170.307	12.8849 - 21.1765	206.792	16.1149 - 25.2435	+	=/P/ur
LinJ.27.0110	Hypotheticalproteinconserved	130.426.065.163	1995	2602	5,00E-05	0.000500685	272.326	199.996 - 344.656	367.514	284.732 - 450.297	+	--

LinJ.10.0590	Hypotheticalproteinunknownfunction	131.164.709.616	3151	4133	5,00E-05	0.000500685	770.429	70.3831 - 83.7027	102.035	94.4208 - 109.65	+	--
LinJ.35.1940	Hypotheticalproteinconserved	131.269.349.845	323	424	0.00245	0.0138346	28.763	18.7361 - 38.7899	35.972	25.115 - 46.829	+	--
LinJ.31.1930	ubiquitin-fusionprotein	131.571.741.512	3652	4805	5,00E-05	0.000500685	470.673	0 - 9.55398	263.772	231.074 - 296.469	+	=
LinJ.28.2630	Hypotheticalproteinconserved	132.027.424.094	1021	1348	5,00E-05	0.000500685	471.661	39.1498 - 55.1825	638.572	54.4418 - 73.2727	+	--
LinJ.21.0820	ATPasesubunit 9 putative	132.641.615.255	1783	2365	5,00E-05	0.000500685	251.948	196.792 - 307.104	327.986	266.767 - 389.205	+	P
LinJ.07.0210	Cytochrome c 1 heme proteinmitochondrial precursor putative	132.676.740.421	3706	4917	5,00E-05	0.000500685	267.735	239.567 - 295.903	374.529	341.352 - 407.706	+	=/Ai/dr
LinJ.26.1680	Fatty acid desaturase putative sphingolipid delta 4 desaturaseputative	132.780.082.988	482	640	0.0207	0.0755212	453.611	1.50296 - 7.56926	62.935	2.71842 - 9.86858	+	=
LinJ.17.1110	Hydrolase alpha/beta fold family-like protein	133.306.581.059	1246	1661	5,00E-05	0.000500685	93.019	78.8206 - 107.217	119.27	103.159 - 135.382	+	=/P/ur
LinJ.35.1240	Short chaindehydrogenaseputative	133.623.910.336	1606	2146	5,00E-05	0.000500685	132.931	112.818 - 153.043	181.764	158.216 - 205.312	+	=/Ai/dr
LinJ.31.2670	Calreticulinputative	133.711.623.462	8371	11193	5,00E-05	0.000500685	519.549	489.769 - 549.328	689.191	655.055 - 723.327	+	=
LinJ.20.0850	Cytochrome c oxidase assembly factor-like protein	134.157.303.371	445	597	5,00E-05	0.000500685	425.201	30.4578 - 54.5824	569.336	42.9345 - 70.9326	+	=/P/dr
LinJ.29.1440	RNA-bindingproteinputative	134.199.134.199	231	310	0.0036	0.0189448	857.995	5.5808 - 11.5791	106.778	7.38573 - 13.9699	+	=
LinJ.35.1540	Rieskeiron- sulfuproteinmitochondrial _precursor putative (RISP)	13.453.522.301	4798	6455	5,00E-05	0.000500685	319.913	291.745 - 348.081	429.207	396.724 - 461.69	+	=
LinJ.24.1300	amastin-like surface protein-like protein	134.578.754.579	1365	1837	5,00E-05	0.000500685	952.792	73.3579 - 117.201	120.389	95.7332 - 145.045	+	=/P/ur
LinJ.29.1470	RNA bindingproteinputative	1.348	250	337	0.00745	0.0340372	933.667	6.34085 - 12.3325	113.456	8.00822 - 14.6831	+	=
LinJ.02.0190	Phosphoglycanbeta 1 2 arabinosyltransferase (SCA1)	134.842.249.657	729	983	5,00E-05	0.000500685	223.293	18.2225 - 26.4362	286.133	23.9674 - 33.2593	+	=
LinJ.12.0430	Hypotheticalproteinunknownfunction	135.245.901.639	488	660	5,00E-05	0.000500685	149.191	11.2943 - 18.544	211.893	16.9784 - 25.4002	+	--
LinJ.33.2080	Hypotheticalproteinconserved	135.403.726.708	483	654	5,00E-05	0.000500685	202.175	15.1752 - 25.2597	267.445	21.0505 - 32.4386	+	--
LinJ.03.0940	Hypotheticalproteinconserved	136.185.925.282	2302	3135	5,00E-05	0.000500685	404.976	334.785 - 475.167	562.068	479.205 - 644.932	+	--
LinJ.31.1470	Hypotheticalproteinunknownfunction	136.681.222.707	687	939	5,00E-05	0.000500685	363.709	28.906 - 43.8357	47.117	38.6474 - 55.5866	+	--
LinJ.21.0070	Hypotheticalproteinconserved	136.748.518.205	1181	1615	5,00E-05	0.000500685	105.205	87.0856 - 123.324	145.369	123.817 - 166.921	+	--
LinJ.32.3770	Hypotheticalproteinconserved	136.791.147.994	2169	2967	5,00E-05	0.000500685	284.884	241.246 - 328.522	362.482	313.251 - 411.712	+	--
LinJ.21.2140	ATP synthase F1 subunit gamma	136.879.432.624	1410	1930	5,00E-05	0.000500685	108.284	91.9564 -	138.795	120.365 -	+	=/Ai/dr

	protein putative							124.612		157.225		
LinJ.28.0350	Hypotheticalproteinconserved	13.698.630.137	365	500	5,00E-05	0.000500685	12.876	9.33412 - 16.4178	177.133	13.5108 - 21.9158	+	--
LinJ.29.1460	RNA bindingproteinputative	137.051.792.829	502	688	5,00E-05	0.000500685	136.374	10.5733 - 16.7014	185.894	15.0419 - 22.1369	+	=/Ai/dr
LinJ.24.0520	Hypotheticalproteinconserved	137.343.358.396	399	548	0.00075	0.00534167	127.158	9.47426 - 15.9574	154.811	11.9273 - 19.0349	+	--
LinJ.25.1210	ATPase beta subunitputative	13.734.939.759	498	684	0.0002	0.00174615	136.875	9.53747 - 17.8376	175.269	12.8305 - 22.2233	+	=/dr
LinJ.08.1010	Hypotheticalproteinconserved	137.401.998.463	6505	8938	5,00E-05	0.000500685	417.659	389.33 - 445.988	567.69	534.987 - 600.392	+	--
LinJ.36.0010	Phosphoglycan beta 1 3galactosyltransferase 4 (SCG4)	137.623.762.376	101	139	0.00525	0.025741	816.441	3.82188 - 12.5069	111.068	6.14377 - 16.0699	+	=/P/ur

FC = FoldChange, RC(GG) = ReadCount (Grupo Grave), RC(GNG) = ReadCount (Grupo Não Grave), FPKM = Fragmentos por quilobase de éxon por milhões de reads mapeadas, IC(GG) = Intervalo de Confiança (Grupo Grave), IC(GNG) = Intervalo de Confiança (Grupo Não grave). R = (Regulação: Upregulation = +/Downregulation= -), Ai/P = Amastigota Intracelular vsPromastigota (= comum, =Ai+ comum, mais expresso em Amastigota Intracelular, =P+ comum, mais expresso em promastigota, dr, downregulated, ur, upregulated, --, não avaliado).

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos no grupo grave classificados pelo Fold Change (FC <-1,5) ou (FC ≥ 1,5)

Anotação	Função do gene anotado	FC	RC GG	RC GNG	p value	FDR	FPKM GNG	IC GNG	FPKM GG	IC GG	R (+/-)	Ai/P
LinJ. 28.2950	heat-shock protein hsp70 putative	0.119658119658	117	14	0.00015	0.00135067	0.34553	0 - 1.14553	448.826	2.34089 - 6.63562	-	=/P/ur
LinJ. 15.1240	Nucleosidetransporter1 putative	0.507194244604	278	141	5,00E-05	0.000500685	347.851	1.45956 - 5.49745	732.675	4.33942 - 10.3141	-	=
LinJ.23. rRNA1	5S(MS) ribosomal RNA	0.868421052632	38	33	5,00E-05	0.000500685	90.347	67.1114 - 113.583	441.067	4.57864 - 877.555	-	P

FC = FoldChange, RC(GG) = ReadCount (Grupo Grave), RC(GNG) = ReadCount(Grupo Não Grave), FPKM = Fragmentos por quilobase de éxon por milhões de reads mapeadas, IC(GG) = Intervalo de Confiança (Grupo Grave), IC(GNG) = Intervalo de Confiança (Grupo Não grave), R = (Regulação: Upregulation = +/Downregulation= -), Ai/P = Amastigota Intracelular vs Promastigota (= comum, = Ai + comum, mais expresso em Amastigota Intracelular, =P+comum, mais expresso em promastigota)

6. Anexos

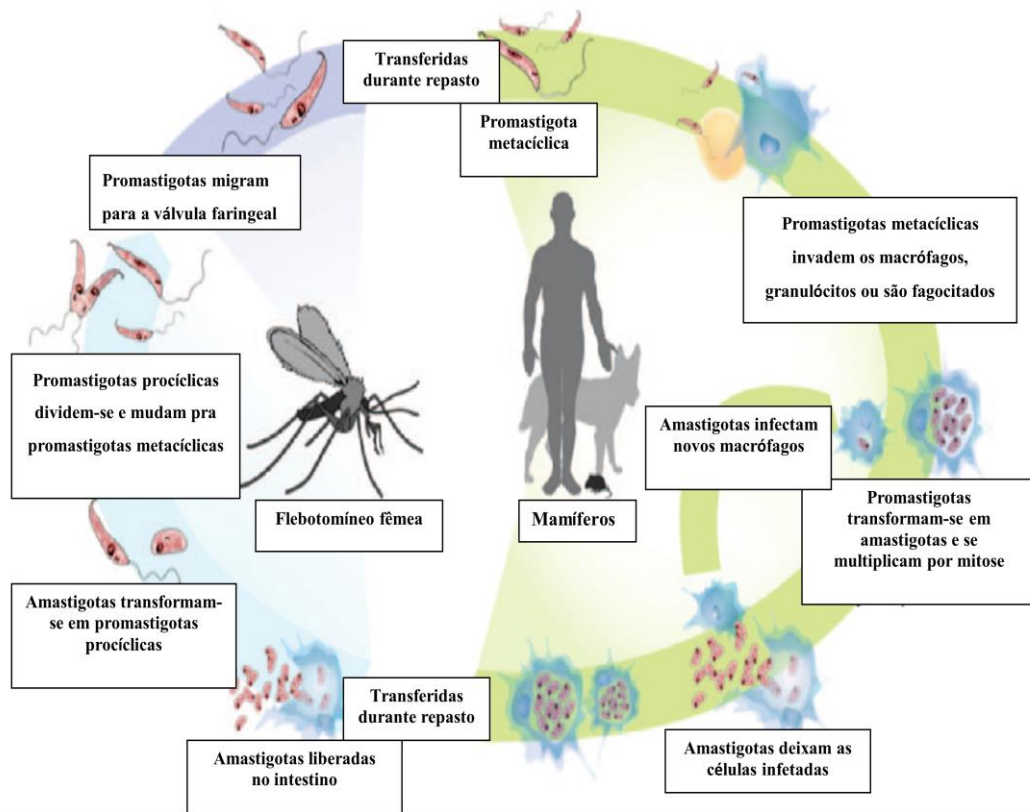


Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania sp.* Adaptada de M.O.; Olliaro, P.L.; Costa, D.L.; Costa, C.H.N. Trends in Parasitology. September 2011, Vol. 27, No.9. Ciclo de vida da leishmaniose visceral (LV). A LV humana é transmitida por vetores fêmeas flebotomíneos que durante o repasto sanguíneo ingerem células infectadas com a protozoário *Leishmania* na forma amastigotas que em seu intestino se transforma em promastigota. Essas formas se desenvolvem e multiplicam e migram para a probóscida, onde são injetadas por fêmeas nos hospedeiros vertebrados mamíferos durante o repasto sanguíneo. No local da picada, promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas. As promastigotas metacíclicas, em seguida, transformam-se dentro destas células em amastigotas, que se multiplicam por divisão simples e prossegue para infectar outras células mononucleares fagocíticas.



Figura 2: Paciente com hepatoesplenomegalia causada pela Leishmaniose visceral.

Fonte: Murray, H.W.; Berman, J.D.; Davies, C.R.; Saravia, N.G. *Advances in leishmaniasis.*

Lancet. 2005. p. 1561–77

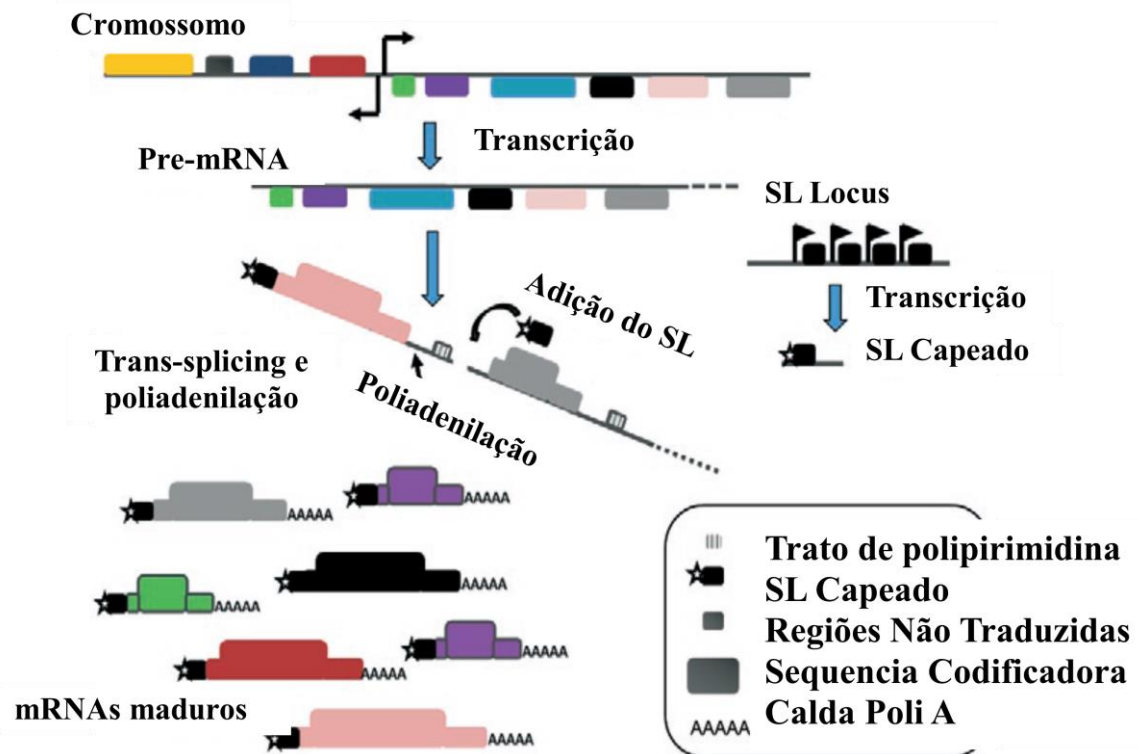


Figura 3: Transcrição e processamento de mRNA em Trypanosomatídeos. Adaptado de Araújo, P. R. e Teixeira S.M. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 106(3): 257-266, 2011. Transcrição e processamento do mRNA em Trypanosomatídeos: Os agrupamentos de genes no genoma são transcritos como pré-mRNA policistrônicos e processados por reações de trans-splicing e poliadenilação. Sequências de Polipirimidinas presentes em regiões intergênicas guiam a inserção de um cap de sequência splicing líder (SL) na extremidade 5' e a cauda poli-A na extremidade 3' dos transcritos, gerando mRNAs maduros monocistrônicos que se acumulam em diferentes níveis no citoplasma.

À
Profª. Ms. DORCAS LAMOUNIER COSTA
Depto. de Medicina Comunitária - CCS

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), da Universidade Federal do Piauí analisou, de acordo com os requisitos da Resolução CNS 196/96, que trata das "diretrizes e normas envolvendo seres humanos", o protocolo de pesquisa encaminhado por V.sa., intitulado "INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO DE LEISHMANIA CHAGASI SOBRE A PATOGENIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL" o qual teve parecer "aprovado" sob o número 0116/2005. Ressaltamos que o parecer consubstanciado emitido na reunião encontra-se arquivado para eventuais consultas.

Atenciosamente,


Profa. Dra. REGINA FERRAZ MENDES
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa