



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Bibiana Paula Dambrós

Estudo comparativo das características biológicas, da transcrição de genes de suscetibilidade à miltefosina e do proteoma de isolados de *Leishmania (L.) infantum* de cães do município de Florianópolis, Santa Catarina

Florianópolis

2023

Bibiana Paula Dambrós

Estudo comparativo das características biológicas, da transcrição de genes de suscetibilidade à miltefosina e do proteoma de isolados de *Leishmania (L.) infantum* de cães do município de Florianópolis, Santa Catarina

Tese submetida ao Programa de Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dambrós, Bibiana Paula

Estudo comparativo das características biológicas, da transcrição de genes de suscetibilidade à miltefosina e do proteoma de isolados de *Leishmania (L.) infantum* de cães do município de Florianópolis, Santa Catarina / Bibiana Paula Dambrós ; orientador, Mário Steindel, 2023.

219 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Leishmaniose Visceral Canina. 3. Miltefosina. 4. Proteoma. 5. Amastigotas Intracelulares. I. Steindel, Mário. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Bibiana Paula Dambrós

Estudo comparativo das características biológicas, da transcrição de genes de suscetibilidade à miltefosina e do proteoma de isolados de *Leishmania (L.) infantum* de cães do município de Florianópolis, Santa Catarina

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 27 de abril de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Héliida Monteiro de Andrade, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Minas Gerais

Prof.(a) Silvane Maria Fonseca Murta, Dr.(a)
Instituição Instituto René Rachou/FIOCRUZ

Prof. Edmundo Carlos Grisard, Dr.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Patrícia Hermes Stoco, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Leonardo Saboia Vahia Matilde, Dr.
Instituição Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociência.

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Mário Steindel
Orientador

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mário Steindel, meu orientador, amigo, conselheiro, minha enorme gratidão. Muito obrigada pela confiança, paciência e compreensão. Obrigada pelas discussões científicas e motivadoras, conversas amigáveis e pelo apoio e ensinamentos em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edmundo Grisard, obrigada pelos cafés, conversas amigáveis, pela amizade, carinho, disponibilidade e apoio essencial nas discussões dos dados desta tese.

À Dra. Patricia Hermes Stoco pela ajuda e apoio essencial para o desenvolvimento dos experimentos de transcrição, sequenciamento e quantificação de DNA, pelos ensinamentos e por me acompanhar com tanto cuidado, pela amizade e carinho nos momentos difíceis.

Ao Dr. Renato de Souza Moreira pela amizade, paciência, análises e discussões dos dados do proteoma.

Ao Doutorando Guilherme Augusto Maia pela disponibilidade no início das análises dos dados do proteoma.

Ao Dr. Leonardo Saboia pela disponibilidade e enorme contribuição nas análises dos dados do proteoma.

À Doutoranda Amábilli de Souza Rosar pelo isolamento dos parasitos, amizade e parceria.

Ao Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo e Dr. Tiago Tizziani pela parceria destes anos.

Aos professores Dra. Patrícia Flávia Quaresma e Dr. Glauber Wagner pela colaboração e aconselhamentos.

À Dra Gislaine Fongaro pelos incentivos e aconselhamentos.

À Iriane Eger, minha grande amiga, que me “colocou na água”, se não fosse por você, jamais estaria defendendo esta tese.

A Laryssa de Liz, Vanessa da Silva, Dr^a. Adriana Silva, Carolina Martins, Ana Paula Bastiani, Beatriz Figueredo, Dr^a Carime Lessa, Vilmar, Ana Claudia Oliveira, Marilene, Milene Moraes, Luiza Schimdt, Luisa Conti, Viviane Flores e aos demais integrantes do laboratório de Protozoologia pela convivência, “discussões”, discussões científicas, apoio e momentos de descontração ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Paulo Carvalho, Dra. Juliana de S. da G. Fischer, Dr. Marlon D.M. Santos e Doutoranda Amanda Caroline Camillo-Andrade da FioCruz do Paraná, Laboratório de proteômica estrutural e computacional, pelo acolhimento em seu laboratório e pela enorme ajuda, sem a qual esse trabalho não teria sido concluído.

A Pós Doc. Greicy B M Dias (LIA-UFSC) e a Dra. Yonne Tenório de Menezes – (LIA-UFSC), Bibiana e a Flávia do LAMEB pela disponibilidade no desenvolvimento de algumas técnicas importantes para o desenvolvimento desta tese.

Ao Programa de Pós-graduação de Biotecnologia e Biociência da Universidade Federal de Santa Catarina, aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq e CAPES pelo incentivo financeiro e pela bolsa de doutorado.

À banca avaliadora deste trabalho, pela disposição e aceite do convite!

Agradeço em especial minha esposa Priscila Jochem por me apoiar e aguentar nestes quatro anos. Obrigada pelo amor, companheirismo e paciência.

Agradeço a minha família, mãe (Vera), pai (Sérgio), “boadrasta” (Mari), minhas irmãs (Cristiane e Fabíola) o meu afiliado e irmão Ricardo, cunhados e cunhadas pela cumplicidade, proteção e carinho nos momentos difíceis.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento pessoal.

Muito Obrigada!!!!

“Não existe meio de verificar qual é a decisão acertada, pois não existe termo de comparação. Tudo é vivido pela primeira vez e sem preparação. Mas o que pode valer a vida, se o primeiro ensaio da vida já é a própria vida?”

Milan Kundera

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma antropozoonose endêmica em franca expansão e urbanização no Brasil onde o cão doméstico é o principal reservatório do parasito. No município de Florianópolis, entre 2010 e 2021, foram registrados mais de 700 casos autóctones de LV em cães e três casos em humanos. O objetivo deste trabalho foi estudar cepas de *L. infantum* isoladas de cães naturalmente infectados, antes (T0) e depois (T1) do tratamento com Milteforan. Os seguintes parâmetros foram avaliados: curva de crescimento, infectividade frente a linhagem celular THP-1, determinação *in vitro* da CI₅₀ da miltefosina, avaliação da transcrição de genes associados a suscetibilidade a miltefosina, identificação do perfil proteômico na presença e ausência de miltefosina *in vitro* e predição os epítomos lineares específicos de células B. A cinética de crescimento entre as cepas isoladas de cães foi similar e distinta da cepa PP75. As cepas isoladas antes e depois do tratamento *in vivo* mostraram capacidade infectiva *in vitro* distinta. Os valores de CI₅₀ da miltefosina para as cepas de cada cão em T0 e T1, não apresentaram diferença, tanto para as formas amastigotas intracelulares quanto para as promastigotas. A transcrição dos genes associados a suscetibilidade a miltefosina revelou modulação dos transcritos em formas promastigotas das cepas tratadas com miltefosina. Nenhuma das cepas mostrou perfil gênico de resistência a miltefosina em nível de sequência nucleotídica e aminoacídica dos genes LiMT e LiRos3. Identificou-se, nas seis cepas nas diferentes condições experimentais, um total de 494 proteínas únicas de *L. infantum*, em 99% destas, foi possível identificar a função. A localização subcelular principal foi citoplasmática (44,33%), seguida da mitocondrial (19,9%). A análise mostrou que 2% das proteínas possuem peptídeo sinal e 7,3% possuem ao menos um domínio transmembranar. O PCA do proteoma mostrou grupos separados, mas com aproximadamente 70% das proteínas compartilhadas entre as cepas do mesmo cão com e sem tratamento. Entre as seis cepas, 225 proteínas únicas foram compartilhadas nas diferentes condições experimentais. As proteínas, com significativa abundância diferencial, não demonstraram alteração de nenhuma proteína associada com o mecanismo de ação ou de resistência a miltefosina. Identificou-se seis epítomos de célula B de cinco proteínas compartilhadas entre as cepas e as espécies de *Leishmania* spp. e um epítomo exclusivo de *L. infantum*. As cepas dos três cães mostraram variações intrínsecas no comportamento biológico, mas não apresentaram fenótipo nem genótipo de resistência à miltefosina.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina; Miltefosina; Proteoma; Amastigota intracelular

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is an expanding endemic anthroponosis in Brazil where the domestic dog acts as the main reservoir of the parasite. Between 2010 and 2021, more than 700 autochthonous cases of VL in dogs and three human cases were recorded in the city of Florianópolis, southern Brazil. The aim of this study was to assess biological parameters of *L. infantum* isolated from naturally infected dogs in this city, before (T0) and after (T1) treatment with Milteforan. The following parameters were evaluated: growth curve, infectivity for THP-1 cell line, *in vitro* determination of IC₅₀ for miltefosine, transcription of genes associated with susceptibility to miltefosine, proteomic profile before and after treatment with miltefosine *in vitro* and prediction of specific B-cell linear epitopes. The growth kinetics between strains isolated from dogs was similar and distinct from the PP75 reference strain. Strains isolated before and after *in vivo* treatment showed distinct infectivity *in vitro*. No differences were observed on the miltefosine IC₅₀ for both intracellular amastigotes and promastigotes (T0 and T1). The transcription of genes associated with susceptibility to miltefosine revealed a positive modulation of transcripts in promastigote forms treated with miltefosine. We have not observed a genetic resistance profile to miltefosine based on the LiMT and LiRos3 genes. A total of 494 unique proteins of *L. infantum* were identified on six strains at different experimental conditions, achieving functional annotation for 99% of them. The main subcellular localizations observed were cytoplasmic (44.33%) and mitochondrial (19.9%). Among these, 2% contain signal peptides and 7.3% contain at least one transmembrane domain. Although ~70% of the proteins were shared between strains from a single dog with and without treatment, PCA analysis indicates some differential clustering. Among the six strains, 225 unique proteins were shared in the different experimental conditions. Proteins showing significant differential abundance are not related to any known biological mechanism related to miltefosine. Only a single, exclusive B cell epitope of *L. infantum* was observed among the six B cell epitopes detected from five distinct *Leishmania* spp. Although intrinsic variations in biological behavior of the strains from these dogs were observed, no evidence of phenotypic or genotypic-related aspects of resistance to miltefosine were detected.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis; Miltefosine; Proteome; Intracellular Amastigota

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais formas celulares durante o ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.	28
Figura 2 – Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.	29
Figura 3 – Distribuição global da endemicidade da Leishmaniose Visceral no ano 2021	34
Figura 4 – Imagem representativa do mecanismo de ação da miltefosina em <i>Leishmania</i> spp.	46
Figura 5 – Estrutura química da miltefosina	48
Figura 6 – Distribuição geográfica do Estado de Santa Catarina, município de Florianópolis, bairros onde cães com LVC já foram notificados e região insular de Florianópolis onde os cães deste estudo residem.....	49
Figura 7 – Delineamento do experimento de infecção e tratamento com miltefosina.	66
Figura 8 – Caracterização molecular das cepas isoladas dos cães por PCR-RFLP ...	89
Figura 9 – Curva de crescimento das formas promastigotas das cepas de <i>L. infantum</i>	90
Figura 10 – Percentual de infecção, número médio de amastigotas e índice de Infecção celular em células THP-1 das cepas de <i>L. infantum</i> nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h.....	93
Figura 11 – Análise da correlação entre a média dos índices de infecção (IF) nos quatro tempos e o percentual de formas promastigotas metacíclicas presentes no momento da infecção	95
Figura 12 – Gráfico representativo da análise de PCA dos genes LiABCG4, LiABCG6, AQP1, LiMT, LiRos3 das cepas de <i>L. infantum</i> tratadas e não tratadas <i>in vitro</i> com miltefosina	99
Figura 13 – Gel representativo do perfil proteico das amostras submetidas a extração de proteínas nas diferentes condições do experimento 5.8.1	104
Figura 14 – Distribuição da média da concentração de proteína total identificada no proteoma de amastigotas das seis cepas de <i>L. infantum</i> não tratadas e tratadas com miltefosina	105
Figura 15 – Diagrama <i>Venn</i> representando a distribuição das proteínas nas cepas isoladas do cão Jack, Otto e Tchopo e	108

Figura 16 – Distribuição das 494 proteínas únicas identificadas no proteoma das seis cepas de <i>L. infantum</i> de acordo com a localização subcelular	110
Figura 17 – Distribuição das 225 proteínas únicas compartilhadas entre as seis cepas isoladas dos cães de acordo com a localização subcelular.	101
Figura 18 – Distribuição das 225 proteínas únicas compartilhadas entre amastigotas das cepas isoladas de cães tratados e não tratados com miltefosina, classificadas pelos termos de GO	103
Figura 19 – Distribuição nos termos de GO enriquecidos das proteínas nas categorias de componente celular função molecular e processo biológico compartilhadas entre amastigotas das cepas isoladas de cães	106
Figura 20 – Distribuição das 225 proteínas únicas entre as seis cepas isoladas de cães tratadas e não tratadas com miltefosina, nos principais grupos funcionais, baseados em dados da literatura.....	118
Figura 21 – PCA e diagrama de <i>Venn</i> da distribuição das proteínas identificadas nas cepas isoladas do cão Jack	109
Figura 22 – Gráfico de vulcano representando a análise de abundância diferencial, categorização funcional de processo biológico e distribuição dos termos de GOs enriquecidos na categoria de componente celular das 59 proteínas diferenciais das cepas JACK_T0 <i>versus</i> JACK_T1	11322
Figura 23 – PCA e diagrama de <i>Venn</i> da distribuição das proteínas identificadas nas cepas isoladas do cão Otto.....	11526
Figura 24 – Diagrama de <i>Venn</i> representando a distribuição das proteínas identificadas nas cepas isoladas do cão Otto.....	11627
Figura 25 – PCA e diagrama de <i>Venn</i> da distribuição das proteínas identificadas nas cepas isoladas do cão Tchopo.....	118
Figura 26 – Gráfico de vulcano representando a análise de dispersão de proteínas, distribuição das 52 proteínas com diferença na abundância na categoria funcional de processo biológico e distribuição dos termos de GOs enriquecidos na categoria de componente celular das cepas TCHOPO_T0 <i>versus</i> TCHOPO_T1	12031

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estadiamento clínico, manejo e tratamento de cães infectados considerados sadios e/ou doentes no Brasil, segundo recomendação da Brasileish (2018)	40
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades moleculares de miltefosina calculadas pelo programa com servidor online Molinspiration (2022) e SwissADME (2022).....	4960
Tabela 2 – Dados epidemiológicos dos cães utilizados neste estudo	51
Tabela 3 – Sequência de iniciadores que foram utilizados no estudo	6273
Tabela 4 – Valores de tempo de duplicação e taxa de crescimento em promastigotas das cepas <i>L. infantum</i>	91
Tabela 5 - Valores de tempo de duplicação e taxa de crescimento de amastigotas das cepas <i>L. infantum</i>	94
Tabela 6 – Percentual de formas promastigotas metacíclicos das cepas de <i>L. infantum</i>	85
Tabela 7 – Valores médios da CI_{50} , CC_{50} , IS, SPI da miltefosina frente as formas promastigotas e amastigotas e o IF das cepas de <i>L. infantum</i>	987
Tabela 8 – Representa a transcrição dos genes de suscetibilidade à miltefosina das cepas de <i>L. infantum</i>	100
Tabela 9 – Concentração celular, percentual de células viáveis, percentual de infecção determinada por citometria de fluxo e carga parasitária por qPCR das células THP1 infectadas com as cepas isoladas de cães do experimento 5.8.1	102
Tabela 10 – Concentração proteica das diferentes condições do experimento 5.8.1	92103
Tabela 11 – Percentual de infecção na linhagem THP-1, o número de proteínas de <i>L. infantum</i> identificadas no proteoma de amastigotas dos seis isolados não tratados e tratados com miltefosina	107
Tabela 12 – Descrição das características das cinco proteínas sem classificação de função em nenhum dos bancos de dados utilizados.....	110
Tabela 13 – Distribuição de epítomos lineares de células B identificados no proteoma de amastigotas dos seis isolados de <i>L. infantum</i> dos três cães.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3' UTR	Região 3' não traduzida dos transcritos
ABCG4	Gene de <i>L. infantum</i>
ABCG6	Glicoproteína
AQP	Aquagliceroporina
ATP	Adenosina trifosfato
Akt	Proteína B quinase
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CC ₅₀	Concentração citotóxica de 50%
CRISPR-Cas9	Técnica que edita os genes cortando precisamente o DNA e permitindo que os processos naturais de reparo do DNA assumam o controle
CP	Concentração de proteína
cDNA	DNA complementar
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CI ₅₀	Concentração que inibe 50% dos parasitos
CNVs	Variações nos números de cópias
DALYs	Óbitos anuais e uma perda de anos de vida útil ajustados em função de incapacidade
DIGE	Técnica de eletroforese diferencial
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DRC	Doença renal crônica
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FeSODA	Gene envolvido na morte celular apoptótica associada ao estresse oxidativo
FT	Falha terapêutica

GAPDH	Gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GO	Ontologia gênica
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
IRIS	International Renal Interest Society
iNOS	Oxido nítrico sintetase
iTRAQ	Técnica que usa reagentes isobáricos para rotular as aminas primárias de peptídeos e proteínas
IPR	Identificação Interpro
IF	Índice de Infecção
IS	Índice de Seletividade
kDA	Massa molecular
kDNA	DNA do cinetoplasto
LC	Leishmaniose cutânea
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada ao Espectrômetro de massa
LiAQP1	Gene de <i>Leishmania infantum</i> aquaporina 1
LiMT	Gene de <i>Leishmania infantum</i> do receptor do tipo P ATPase
LiRos3	Gene de <i>Leishmania infantum</i> da subunidade β do LiMT
LiABCG4	Gene de <i>Leishmania infantum</i> transportador ATP-binding cassette subfamília C membro 4
LiABCG6	Gene de <i>Leishmania infantum</i> transportador ATP-binding cassette subfamília C membro 6
LMT	Transportador amino fosfolípido translocase de miltefosina do tipo P ATPase
LPS	Lipopolissacarídeos
LRos3	Subunidade β não catalítica de LMT
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose visceral

LVC	Leishmaniose visceral canina
LVH	Leishmaniose visceral humana
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mil	Miltefosina
MS	Ministério da Saúde
MSL	Locus sensibilidade à miltefosina
PMBC	Células mononucleares do sangue periférico
PC	Fosfatidilcolina
PCA	Análise de componente principal
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PCR-RFLP	Reação de cadeia de polimerase – Reação de restrição de fragmentos polimórficos
PE	Fosfatidiletanolamina
PGE2	Prostaglandina E ₂
PI	Ponto Isoelétrico
PI- 3-kinase	Inibidor da alquilfosfocolina
PL	Fosfolipídios
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PSS	Pressão sistêmica sanguínea
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas a oxigênio
RPC	Razão proteína-creatinina urinárias
SBF	Soro bovino fetal
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SILAC	Isótopos estáveis de aminoácidos em cultura de células
SIR2	Gene envolvido na morte celular apoptótica associada ao estresse oxidativo
SL	Localização subcelular
SL	Esfingolipídios
SPI	Índice de especificidade
TA	Temperatura Ambiente

TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TD	Tempo de duplicação
TEAB	Bicarbonato de trietilamônio
TCD4 Th	Linfócito parasitário
Th1	Linfócito T auxiliar tipo1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo2
THP-1	Perfis de expressão de proteínas de células de linhagem monocítica humana
TM	Domínio de transmembrana
TNF- α	Fator de necrose tumoral – alfa
TP	Total de proteína
TPA	Abordagem de proteína total
TR	Teste imunocromatográfico rápido

LISTA DE SÍMBOLOS

°C Celcius

μM Micromolar

μg Micrograma

μL Microlitro

CO₂ Dióxido de carbono

g Gravidade

kDa KiloDalton

Ln Logaritmos naturais

M Molar

Mpb Mega pares de base

mg miligrama

mL Mililitro

Pb Pares de base

pH Potencial Potencial hidrogeniônico

UI Unidades Internacionais

nm Nanômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	PARASITO.....	17
1.2	LEISHMANIOSE VISCERAL	19
1.3	EPIDEMIOLOGIA.....	22
1.4	PATOGENIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL	24
	1.4.1 Desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro direcionada a	
	<i>Leishmania spp.</i>	24
1.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	
	26
1.6	TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	28
1.7	MECANISMO DE AÇÃO E RESISTÊNCIA À MILTEFOSINA	34
1.8	VACINA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	39
1.9	PROTEOMA EM LEISHMANIA	39
2	JUSTIFICATIVA	46
3	HIPÓTESE	47
4	OBJETIVOS	47
4.1	OBJETIVO GERAL	47
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
5	MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	48
5.2	PROPRIEDADES DO FÁRMACO	48
5.3	ÁREA DE ESTUDO	49
5.4	CARACTERÍSTICAS DOS CÃES.....	50
5.5	PARASITOS E CÉLULAS.....	52
	5.5.1 Origem dos parasitos e células	52
	5.5.2 Cultivo dos parasitos e das células THP-1	52
5.6	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA CEPAS DE <i>L. infantum</i>	
	ISOLADAS DE CÃES.....	53
	5.6.1 Caracterização molecular dos isolados de <i>Leishmania infantum</i> de cães	
	antes e após o tratamento com miltefosina	53
	5.6.2 Curva de crescimento dos parasitos	54
	5.6.3 Infecção in vitro de células THP-1 pelas cepas de <i>L. infantum</i>	54

5.6.4 Avaliação da atividade leishmanicida da miltefosina nas formas amastigotas de <i>L. infantum</i>	55
5.6.5 Avaliação da atividade leishmanicida da miltefosina nas formas promastigotas das cepas de <i>L. infantum</i>	57
5.6.6 Avaliação da citotoxicidade da miltefosina em células THP-1	57
5.6.7 Determinação do percentual de formas promastigotas metacíclicas na cultura	58
5.6.8 Determinação do índice de especificidade (SPI) da miltefosina	58
5.6.9 Fator Z	59
5.6.10 Análise estatística da caracterização biológica das cepas de <i>L. infantum</i>	59
5.7 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À MILTEFOSINA POR MEIO DA ANÁLISE DE TRANSCRIÇÃO DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE À MILTEFOSINA E SEQUENCIAMENTO GÊNICO DAS CEPAS DE <i>L. infantum</i>	60
5.7.1 Interação das formas promastigotas das cepas <i>L. infantum</i> isoladas dos cães na presença ou ausência da miltefosina	60
5.7.1.1 <i>Coleta das amostras do ensaio e armazenamento</i>	60
5.7.1.2 <i>Extração, purificação e quantificação do RNA</i>	60
5.7.1.3 <i>Síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	61
5.7.1.4 <i>Quantificação da transcrição de genes associados a suscetibilidade à miltefosina por qPCR</i>	61
5.7.1.5 <i>Cálculo para a obtenção do número de transcritos e valores de transcrição</i>	62
5.7.2 Preparação das formas promastigotas das cepas de <i>L. infantum</i> isoladas dos cães para sequenciamento	63
5.7.2.1 <i>Extração do DNA das cepas de <i>L. infantum</i></i>	63
5.7.2.2 <i>Análise das sequências dos genes <i>LiABCG6, LiABCG4, AQP1, LiMT</i> e <i>LiRos3</i> envolvidos na suscetibilidade a miltefosina das cepas de <i>L. infantum</i> isoladas de cães</i>	63
5.8 ANÁLISE PROTEÔMICA DAS CEPAS <i>L. infantum</i> ISOLADAS DE CÃES ..	64
5.8.1 Interação das células THP-1 infectadas pelas cepas de <i>L. infantum</i> isoladas de cães na presença ou ausência da miltefosina	64
5.8.1.1 <i>Coleta das amostras e armazenamento das células THP-1 infectadas pelas cepas de <i>L. infantum</i> isoladas de cães</i>	66

5.8.1.2	<i>Determinação da concentração celular em câmara de Neubauer das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães.....</i>	67
5.8.1.3	<i>Quantificação do percentual de infecção das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães utilizando a técnica de citometria de fluxo ...</i>	67
5.8.1.4	<i>Estimativa da carga parasitária por qPCR das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães</i>	68
5.8.1.5	<i>Extração, purificação e quantificação das proteínas em solução obtidas das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães.....</i>	69
5.8.1.6	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS PAGE das proteínas obtidas das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães.....</i>	70
5.8.1.7	<i>Digestão das proteínas obtidas das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães.....</i>	70
5.8.1.8	<i>Dessalinização dos peptídeos do proteoma das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães</i>	71
5.8.1.9	<i>Aquisição dos dados do proteoma das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães.....</i>	71
5.8.1.10	<i>Processamento dos dados do proteoma das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães</i>	72
5.8.1.11	<i>Dados gerados do proteoma das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães.....</i>	73
5.8.1.12	<i>Análise dos dados do proteoma das cepas de L. infantum isoladas de cães.....</i>	73
5.8.1.13	<i>Análise funcional e análise funcional de enriquecimento do proteoma das cepas de L. infantum isoladas de cães.....</i>	75
5.8.1.14	<i>Disponibilidade dos dados do proteoma das cepas de L. infantum isoladas de cães.....</i>	77
5.8.2	<i>Predição de epítomos de células B no proteoma de cepas de L. infantum isoladas de cães.....</i>	77
6	RESULTADOS.....	78
6.1	ANÁLISE DA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DAS CEPAS ISOLADAS DE CÃES	78
6.1.1	Caracterização molecular das cepas de <i>Leishmania</i> spp. isoladas de cães por PCR-RFLP	78

6.1.2	Curva de crescimento das formas promastigotas das cepas de <i>L. infantum</i>	79
6.1.3	Caracterização in vitro da infectividade das cepas de <i>L. infantum</i> em células THP-1	81
6.1.4	Correlação entre IF e promastigotas metacíclicos das cepas de <i>L. infantum</i>	83
6.1.4.1	<i>Determinação do percentual médio de promastigotas metacíclicos dos das cepas de <i>L. infantum</i></i>	84
6.1.5	Caracterização in vitro da suscetibilidade a miltefosina das cepas de <i>L. infantum</i> nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares	85
6.2	ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES DE SUSCETIBILIDADE À MILTEFOSINA NAS CEPAS ISOLADAS DE CÃES E CEPA PP75	88
6.2.1	Análise da transcrição dos genes de suscetibilidade à miltefosina nas formas promastigotas nas cepas de <i>L. infantum</i>	88
6.2.2	Análise das sequências dos genes suscetibilidade a miltefosina das formas promastigotas de <i>L. infantum</i> das cepas isoladas de cães	90
6.2.2.1	<i>Alinhamento das sequências nucleotídicas e aminoacídicas referentes aos genes relacionados a suscetibilidade a miltefosina em <i>Leishmania</i> spp.</i>	90
6.3	ANÁLISE PROTEOMICA DAS FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES DAS CEPAS ISOLADAS DE CÃES	90
6.3.1	Determinação da viabilidade celular, percentual de infecção e carga parasitária do experimento 5.8.1	90
6.3.2	Proteômica das células THP-1 e formas amastigotas das cepas de <i>L. infantum</i> isoladas de cães	92
6.3.2.1	<i>Extração e quantificação de proteínas das células THP-1 e das formas amastigotas intracelulares das cepas isoladas dos cães Jack, Otto e Tchopo</i>	92
6.3.2.2	<i>Eletroforese de poliacrilamida - SDS PAGE - das amostras submetidas a extração de proteínas</i>	93
6.3.3	Análise dos dados do proteoma das formas amastigotas intracelulares das cepas isoladas dos cães Jack, Otto e Tchopo	93
6.3.3.1	<i>Análise comparativa do proteoma total de amastigotas das cepas isoladas de cães</i>	97
6.3.3.2	<i>Características qualitativas e quantitativas das proteínas únicas identificadas no proteoma total de amastigotas das cepas isoladas de cães</i>	99

6.3.4	Caracterização das proteínas únicas identificadas e compartilhadas entre amastigotas das cepas isoladas de cães	100
6.3.4.1	<i>Análise Funcional das proteínas compartilhadas entre amastigotas das cepas isoladas de cães baseada nas categorias componente celular, processo biológico e função molecular</i>	101
6.3.4.2	<i>Análise de enriquecimento funcional das proteínas compartilhadas entre cepas isoladas dos cães baseadas nas categorias componente celular, processo biológico e função molecular</i>	105
6.3.4.3	<i>Análise dos grupos funcionais das proteínas compartilhadas das cepas isoladas de cães baseada em dados da literatura</i>	107
6.3.5	Análise comparativa do proteoma de amastigotas das cepas isoladas do cão Jack	109
6.3.5.1	<i>Análise das proteínas identificadas nas formas amastigotas das cepas isoladas no cão Jack</i>	109
6.3.5.2	<i>Análise da abundância de proteínas diferencialmente expressas nas cepas JACK_T0 e JACK_T1 tratadas e não tratadas com miltefosina</i>	111
6.3.5.3	<i>Análise funcional e enriquecida das proteínas com diferença na abundância entre as cepas JACK_T0 e JACK_T1 baseada nas categorias de GO</i> Erro! Indicador não definido.	
6.3.5.4	<i>Características qualitativas e quantitativas, análise funcional e enriquecida baseada nas categorias de GO da proteína identificada exclusivamente nas cepas isoladas do cão Jack</i>	114
6.3.6	Análise comparativa do proteoma de amastigotas das cepas isoladas do cão Otto	114
6.3.6.1	<i>Análise das proteínas identificadas nas formas amastigotas das cepas isoladas no cão Otto</i>	114
6.3.6.2	<i>Análise da abundância de proteínas diferencialmente expressas nas cepas OTTO_T0 e OTTO_T1 tratadas e não tratadas com miltefosina</i>	116
6.3.5.3	<i>Caracterização, análise funcional enriquecida das proteínas identificadas exclusivamente nas cepas isoladas do Cão Otto baseada nas categorias de GO</i> ..	116
6.3.7	Análise comparativa do proteoma de amastigotas das cepas isoladas do cão Tchopo	117
6.3.7.1	<i>Análise das proteínas identificadas nas formas amastigotas das cepas isoladas no cão Tchopo</i>	117

6.3.7.2	<i>Análise da abundância, análise funcional e enriquecida das proteínas diferencialmente expressas nas cepas TCHOPO_T0 e TCHOPO_T1 tratadas e não tratadas com miltefosina</i>	119
6.3.7.3	<i>Análise funcional e enriquecida das proteínas identificadas exclusivamente no cão Tchopo baseada nas categorias de GO</i>	122
6.4	PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS B	122
7	DISCUSSÃO	126
8	CONCLUSÕES	144
9	PERSPECTIVAS	145
	REFERÊNCIAS	146
	ANEXO A – CURVA DE DISSOCIAÇÃO DOS INICIADORES DOS GENES ABCG4, ABCG6, AQP1, LIMT, LIROS3 E GAPDH RELACIONADOS A SUSCETIBILIDADE A MILTEFOSINA EM <i>L. infantum</i>	180
	ANEXO B – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS REFERENTES AOS GENES ABCG4, ABCG6, AQP1, LIMT E LIROS3 RELACIONADOS A SUSCETIBILIDADE A MILTEFOSINA EM <i>Leishmania</i> spp.	16982
	ANEXO C – MATRIZ DE IDENTIDADE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS REFERENTES AOS GENES ABCG4, ABCG6, AQP1, LIMT, LIROS3 RELACIONADOS A SUSCETIBILIDADE A MILTEFOSINA EM <i>Leishmania</i> spp	20187
	ANEXO E – PUBLICAÇÕES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO	219

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* pertencentes ao filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, que inclui outros parasitos de humanos (gênero *Trypanosoma*), de plantas (gênero *Phytomonas*) e de insetos (gêneros *Leptomonas* e *Crithidia*) (SIMPSON et al., 2004). As leishmanioses compõem o grupo das 20 doenças tropicais negligenciadas – DTNs, presentes nas regiões tropicais e subtropicais do globo (BOELAERT; SUNDAR, 2014; AKHOUNDI et al., 2016).

Dezenas de espécies de mamíferos, incluindo humanos, podem atuar como reservatórios naturais do parasito, sendo o parasito transmitido pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, durante o repasto sanguíneo (BOELAERT; SUNDAR, 2014; MARCONDES et al., 2017).

As leishmanioses são endêmicas em 98 países e territórios de áreas tropicais e subtropicais do globo onde estima-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas ocasionando cerca de 50.000 óbitos anuais e uma perda de anos de vida útil ajustados em função de incapacidade (*DALYs*) da ordem de 2,3 milhões de anos/ano (ALVAR et al., 2012; WHO, 2022). Estima-se que mais de 350 milhões de pessoas vivem em áreas com risco de transmissão do parasito e que fatores como a migração humana, atividades antrópicas e mudanças climáticas, entre outras, contribuem para a expansão e urbanização da doença (ALVAR et al., 2012; WHO, 2022).

A leishmaniose visceral humana (LVH) caracteriza-se como uma doença sistêmica severa, causada pela *L. (L.) donovani* no Velho Mundo e pela *L. (L.) infantum* no Novo Mundo (BOELAERT; SUNDAR, 2014). A LVH é caracterizada clinicamente por febre irregular prolongada, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia, podendo ser fatal quando não tratada em tempo ou quando ocorre a coinfeção com o vírus HIV o que é fator de piora no prognóstico da doença (COURA-VITAL et al., 2014, LIMA et al., 2018).

A espécie *L. infantum* também é causadora da leishmaniose visceral em cães (LVC). A importância dos cães como reservatórios urbanos do parasito, tem recebido grande atenção dos órgãos de saúde pública, uma vez que há uma correlação positiva entre a prevalência de LVH com a população de cães infectados e é sabido que a LVC precede a LVH em uma dada região (MATSUMOTO et al., 2021).

O combate a LVC por meio da eutanásia de cães soropositivos (BRASIL, 2014), praticada desde a década de 1950, quando adotada isoladamente, não resulta em redução na prevalência em cães (KAZIMOTO et al., 2018; SEVÁ et al., 2016), além de ser pouco aceita eticamente pela população em geral e principalmente pelas ONGs que atuam na defesa do bem-estar animal (OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013; WERNECK et al. 2010). Em face disso, em 2016 foi aprovado pelo Ministério da Saúde e concedido o registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do medicamento Milteforan® (Virbac®) - miltefosina (hexadecilfosfocolina, Mil) - para uso exclusivamente veterinário no tratamento da LVC. A partir de então, várias regiões do país passaram a fazer o tratamento de cães soropositivos o que vem sendo tema polêmico de debate. Embora seja observada melhora clínica notável dos sintomas nos cães tratados com o Milteforan®, não há a eliminação completa dos parasitos e com isso, há a preocupação de seleção de parasitos resistentes (GONÇALVES et al., 2019; NOGUEIRA et al., 2019).

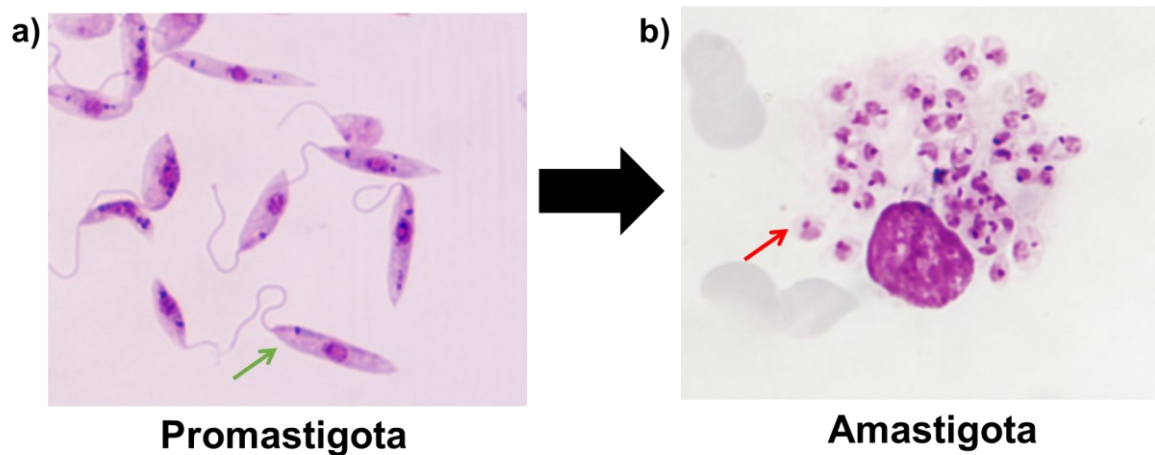
O fracasso terapêutico e a recidiva nas leishmanioses são conhecidos por possuírem origem multifatorial, envolvendo características relacionadas ao hospedeiro (imunidade, fatores genéticos e nutricionais, entre outros), ao fármaco (qualidade, farmacocinética) e ao parasito (resistência aos fármacos, aumento da infectividade, coinfeção com outros patógenos), entre outros (GÓMEZ PÉREZ et al., 2016). O surgimento de parasitos resistentes tem sido relatado frequentemente e a resistência do parasito aos medicamentos para o tratamento vem se tornando um relevante problema de saúde pública. Embora a ocorrência de falha terapêutica das leishmanioses em humanos com o uso de antimoniais pentavalentes seja bem conhecida (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006), as informações disponíveis sobre parasitos resistentes aos fármacos utilizados no tratamento de cães são limitadas (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

Dessa forma, monitorar a ocorrência de parasitos resistentes, bem como compreender aspectos biológicos e bioquímicos envolvidos neste processo, tanto de parasitos isolados de cães como de humanos é de grande relevância para mitigar os possíveis impactos em termos de saúde pública decorrentes do surgimento e da disseminação de parasitos resistentes aos medicamentos nestas populações (VERAS; MENEZES, 2016; CARNIELLI et al., 2018; CRUZ; FREITAS-CASTRO, 2019).

1.1 PARASITO

As leishmanias são parasitos dimórficos e apresentam dois estágios morfológicos principais: a forma promastigota, flagelada (Figura 1) encontrada no trato digestório do inseto vetor e a qual se propaga quando em cultura *in vitro*, e a forma amastigota encontrada no interior de células mononucleares do sistema fagocítico de hospedeiros mamíferos (BOELAERT; SUNDAR, 2014).

Figura 1 – Principais formas celulares durante o ciclo biológico da *Leishmania* spp.



Imagens de microscópio óptico com aumento de 1000x dos principais estágios do ciclo biológico de *Leishmania*, a forma promastigota foi cultivado em cultura (seta verde), a forma amastigota no interior do macrófago de cão (seta vermelha).
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As fêmeas de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) atuam como transmissoras do parasito e, em relação a capacidade vetorial, mais de 90 espécies são reconhecidas como transmissores do parasito no mundo, das quais 18 nas Américas (LAINSON; SHAW, 1987; PAHO; WHO, 2022; NACIF-PIMENTA et al., 2020).

A transmissão das leishmanioses entre hospedeiros mamíferos, resumidamente, ocorre quando promastigotas do parasito são regurgitadas pela fêmea do flebotomíneo no local da picada na pele do hospedeiro durante o repasto alimentar. A Figura 2 mostra o ciclo biológico representativo de *Leishmania* spp, as promastigotas (Figura 1a) são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear no local da picada, onde passam a estar localizadas dentro de vacúolos parasitóforos. As promastigotas se diferenciam em formas amastigotas, sendo

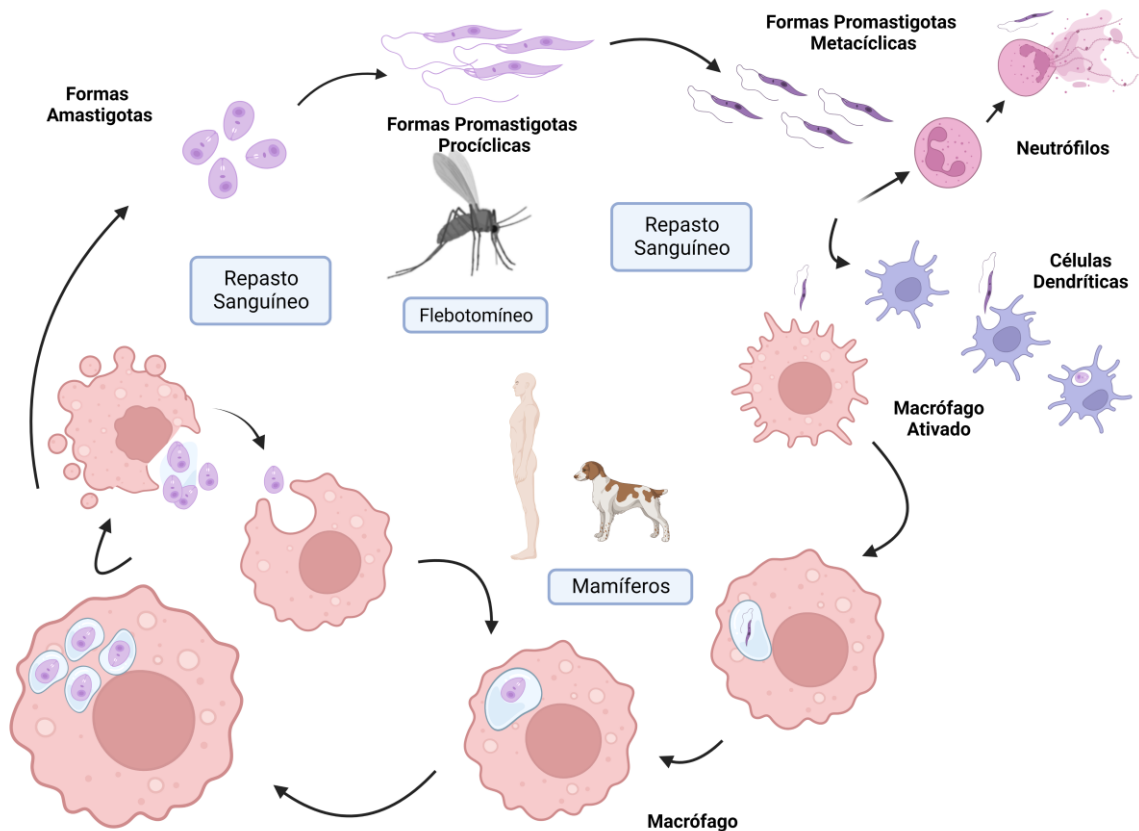
caracteristicamente arredondadas ou ovaladas e com flagelo rudimentar não exteriorizado, passando a realizar sucessivos ciclos de divisão por fissão binária. Após sua liberação em função do rompimento da célula hospedeira, estas formas são infectivas para outros fagócitos, os quais são sugados pelas fêmeas do vetor em um novo repasto alimentar (ANVERSA et al., 2018; ROSSI; FASEL, 2018).

No intestino médio do flebotomíneo, as amastigotas (Figura 1a) são liberadas da célula hospedeira e se diferenciam em promastigotas procíclicas, que apresentam baixa motilidade e alta capacidade replicativa (LESTINOVA et al., 2017).

Após 48-72 horas, as promastigotas procíclicas diferenciam-se em promastigotas nectomonadas com alta motilidade e reduzida capacidade replicativa. Estas formas rompem a membrana peritrófica e migram para o intestino anterior, transformando-se em promastigotas leptomonadas que entram novamente em processos de divisão binária. Após sucessivos ciclos de divisão binária, o parasito migra e coloniza a válvula estomodeal do inseto vetor, onde se diferenciam promastigotas metacíclicas, as quais são regurgitadas na pele do hospedeiro durante repasto alimentar subsequente, dando continuidade ao ciclo biológico do parasito (SERAFIM et al., 2018).

Importante salientar, que estudos recentes mostraram que quando as fêmeas infectadas pelo parasito efetuam o segundo repasto alimentar, aumentam significativamente seu potencial de transmissão devido as novas formas encontradas denominadas de retroleptomonas que, ao se diferenciarem na forma promastigota metacíclica, incrementam características mais virulentas (SERAFIM et al., 2018).

Embora dezenas de espécies de mamíferos pertencentes a seis ordens possam atuar como reservatórios naturais do parasito, no caso de *L. infantum* o cão doméstico é o mais importante reservatório urbano da doença (BOELAERT; SUNDAR, 2014).

Figura 2 – Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

Ao efetuar o repasto sanguíneo o flebotomíneo pode ingerir a forma amastigota de *Leishmania* oriunda de um macrófago infectado. O amastigota de *Leishmania* se diferencia na forma promastigota próciclica no estômago do inseto. Os promastigotas próciclicos diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, forma infectiva não replicativa, que se acumulam na porção anterior do esôfago e proventrículo do inseto. Na próxima alimentação, o flebotomíneo ao efetuar o repasto sanguíneo regurgita as formas promastigotas metacíclicas no tegumento do hospedeiro mamífero, junto com vários componentes salivares. Os promastigotas metacíclicos são então fagocitados por macrófagos e/ou vários tipos de células possíveis no local da picada, como neutrófilos e células dendríticas. No fagocitismo dos macrófagos, os parasitos se diferenciam nas formas amastigotas, multiplicando-se por divisão binária, permitindo a reinfecção de células locais.

Fonte: Adaptado do ciclo de Laranjeira-Silva, Hamza e Pérez-Victoria (2020).

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

A dispersão de LV na Região Sul do Brasil é recente. Os primeiros registros da LVC e LVH autóctones ocorreram no estado do Rio Grande do Sul em 2008 e 2009, respectivamente (DEBONI et al., 2011). No estado de Santa Catarina, em 2010 foi registrado o primeiro surto de LVC na localidade de Canto dos Araçás, bairro da Lagoa da Conceição, região leste de Florianópolis (FIGUEIREDO et al., 2012; STEINDEL et al., 2013; GOVERNO DE SANTA CATARINA, 2022) e em 2017 foram reportados três casos humanos autóctones em Florianópolis (GOVERNO DE SANTA CATARINA,

2017). No estado do Paraná, a primeira detecção de vetores e cães com diagnóstico de LVC autóctone foi em 2012, enquanto o primeiro caso humano foi registrado em 2016 (PASQUALI et al., 2019). Dessa forma, até 2007 a região Sul não era considerada área endêmica para LV e apenas poucos casos humanos importados haviam sido reportados. No entanto, atualmente, um crescente número de casos de LVC e LVH com transmissão autóctone tem sido registrado nos três estados da região sul (STEINDEL et al., 2013; REIS et al., 2017).

No Brasil, *L. infantum* é transmitida, principalmente, pela *Lutzomia longipalpis*. No entanto, outras espécies de flebotomíneos vem sendo incriminadas na transmissão de LV, incluindo *Lu. cruzi*, *Migonemyia migonei* e *Lu. evansi* (SANTOS et al., 2003). No município de Florianópolis foram identificadas quatro espécies de flebotomíneos *Brumptomyia* sp., *Lu. fischeri*, *Mi migonei*, *Nyssomyia neivai*, sendo confirmada por reação em cadeia da polimerase (PCR) a infecção *Ni. neivai* por *Leishmania* spp. (DIAS, 2010). A ausência do vetor clássico *Lu. longipalpis*, e a elevada prevalência de cães positivos para LV sugere que outras espécies estejam envolvidas na transmissão de *L. infantum* entre cães e humanos no município de Florianópolis (STEINDEL et al., 2013).

A LV, no Brasil, é uma antropozoonose que possui como principal reservatório o cão doméstico (*Canis familiaris*), ainda estando envolvidos outros mamíferos selvagens como a raposa no ciclo de transmissão silvestre (ROMERO; BOELAERT, 2010). A infecção natural no gato doméstico (*Felis catus*) também tem sido descrita, demonstrando a necessidade de estudos que esclareçam o real papel destes animais como reservatórios do parasito (PENNISI; PERSICHETTI, 2018). Nos últimos anos, o padrão de transmissão da LV mudou devido a uma intensa migração da população humana para regiões urbanas e periurbanas, usualmente levando seus cães, para áreas onde ocorreu a adaptação de flebotomíneos em ambientes peri-urbanos, permitindo o estabelecimento de um ciclo de transmissão tornando a LV humana e canina uma endemia em franca expansão nos diferentes ambientes (REIS et al., 2017).

No Brasil, 24 dos 27 estados atualmente são considerados endêmicos para LV com taxas de transmissão variáveis (BRASIL, 2022). Embora seja observada uma maior incidência de LV humana na região Nordeste, novas áreas endêmicas nas regiões sudeste, norte, centro-oeste e sul foram registradas nas últimas décadas

(WERNECK, 2008). É válido salientar que na região sul do Brasil, a LV ocorre principalmente em áreas urbanas (PASQUALI et al., 2019).

O gênero masculino é mais comumente afetado que o feminino. Segundo Lima et al. (2018) a incidência de LV em crianças abaixo de 10 anos vem diminuindo nos últimos anos simultaneamente com o aumento na incidência em adultos. Acredita-se que a redução de LV entre as crianças está associada a melhora na situação socioeconômica e do estado nutricional (LIMA et al., 2018). Estudo de Machado et al. (2020), mostra que crianças abaixo de 10 anos durante o período de 2007 a 2017 juntamente com o gênero masculino ainda representam a maioria dos casos de LV em áreas urbanas do Nordeste brasileiro e afirma que o perfil da LV neste período permanece inalterado e que as melhorias sociais alcançadas nessa região, ainda não foram suficientes para mitigar o risco de transmissão da doença (MACHADO et al., 2020).

A LVC se caracteriza por uma ampla gama de manifestações clínicas, podendo variar de uma ausência total de sinais clínicos a uma doença clínica grave e fatal. Na LVC causada pela *L. infantum*, os sinais clínicos mais comuns entre uma grande variedade de outras condições clínicas são lesões cutâneas, perda de peso, anorexia, letargia, linfadenomegalia generalizada, alopecia, unicoríose e lesões oculares (BAXARIAS et al., 2019).

Em cães assintomáticos, os parâmetros hematológicos e bioquímicos geralmente permanecem inalterados, enquanto em cães sintomáticos podem ocorrer alterações que auxiliam no diagnóstico da infecção e no prognóstico do tratamento. Cães sintomáticos mostram uma diminuição significativa de glóbulos vermelhos, linfócitos, eosinófilos e plaquetas. Os parâmetros bioquímicos podem ser usados para avaliar o estado geral de saúde na LVC. Quando em curso, a doença é caracterizada por hiperproteinemia, hipoalbuminemia e alterações nas concentrações de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, ureia e creatinina. Esses parâmetros são marcadores interessantes para o acompanhamento terapêutico, principalmente aqueles relacionados aos rins, uma vez que o dano a esse órgão associado à doença é quase inevitável (RIBEIRO et al., 2018; GONÇALVES et al., 2019).

O entendimento dos fatores de risco para o desenvolvimento da doença clínica ainda é parcialmente compreendido. Estudos sugerem que a suscetibilidade à

LV está geneticamente determinada (JERONIMO et al., 2007), outros evidenciam uma forte correlação com o estado de má nutrição no desenvolvimento da infecção por *Leishmania* spp. e que a desnutrição prejudicaria a competência imune de pacientes acometidos e poderia ser um fator causal de aumento na suscetibilidade desta doença infecciosa especialmente em crianças (MALAFAIA, 2009). Outros estudos afirmam que o mais importante fator de risco para a LV humana seria a permanência de cães infectados vivendo no domicílio (LÓPEZ et al., 2016) e residir em casas com inadequado sistema de coleta de lixo em favelas urbanas e em áreas verdes onde há ocorrência do vetor (COSTA et al., 2005).

Todas as raças de cães são potencialmente suscetíveis a *L. infantum* e fatores como idade, sexo, pelagem e proporção do tempo passado ao ar livre (especialmente durante a noite) podem influenciar a probabilidade e o resultado da infecção. No entanto, foi estabelecido que raças mestiças e autóctones de áreas endêmicas desenvolvem vários graus de resistência a LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2000; HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017).

Nos últimos anos, tem se tornado cada vez mais evidente que nem todas as infecções por *Leishmania* spp. apresentam sintomas e que os parasitos podem persistir tanto em humanos quanto em cães apresentando infecções subclínicas por vários anos. Acredita-se que esses casos subclínicos constituam um importante reservatório para espécies antroponóticas de *Leishmania* spp., mas que podem exacerbar em casos permanentes ou com supressão imunológica temporária (GRÜNEBAST; CLOS, 2020). Em termos gerais, a prevalência de casos caninos precede e coincide com a ocorrência subsequente de casos humanos, demonstrando uma associação espacial entre casos humanos e caninos (MATSUMOTO et al., 2021).

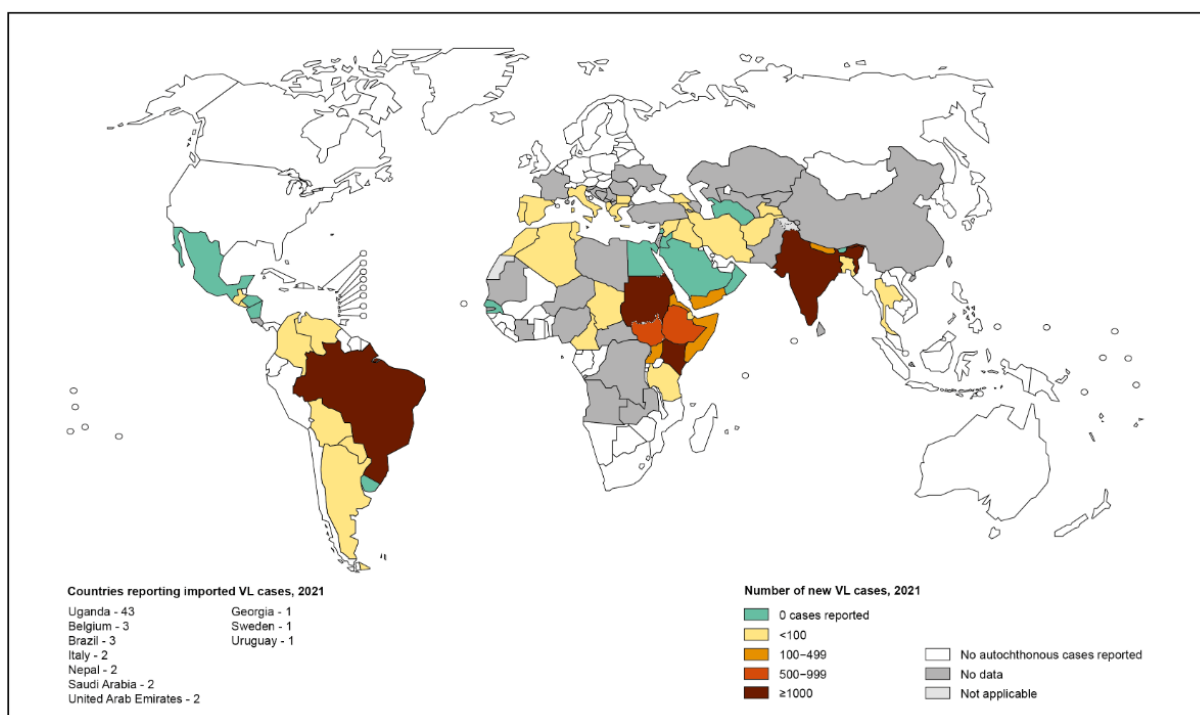
1.3 EPIDEMIOLOGIA

Em 2018, casos de LVH foram reportados em 83 países e territórios de áreas tropicais e subtropicais do globo (Figura 3) (RUIZ-POSTIGO; GROUTA; JAIN, 2020). Estima-se que anualmente ocorram entre 0,2 a 0,4 milhões de casos de LVH, embora estes números possam estar subestimados, frente a expansão e urbanização da doença. Também na região do Mediterrâneo, a LVC precede surtos de LVH, onde

estima-se que 2,5 milhões de cães estejam infectados (AKHOUNDI et al., 2016; HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017).

A LV é endêmica em 13 países das Américas, onde 69.665 novos casos humanos foram registrados entre 2001 e 2021, com uma média decrescente de 1.799 casos em 2021. Em 2021, do total de casos, 93,5% foram notificados no Brasil, e os demais casos na Argentina, Bolívia, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai, Uruguai e Venezuela (PAHO, WHO, 2022; OPAS, 2022). O número de cães infectados por *L. infantum* na América do Sul é estimado em milhões e a alta taxa de infecção canina, especialmente no Brasil, está fortemente associada ao risco de desenvolvimento da doença em humanos (MARCONDES; DAY, 2019). Estudos em diferentes áreas endêmicas brasileiras estimam uma prevalência de LVC entre 11,2 e 19,6% (CARVALHO; DIAS; ALMEIDA, 2020; D'ANDREA et al., 2015; DANTAS-TORRES et al., 2020).

Figura 3 – Distribuição global da endemicidade da Leishmaniose Visceral no ano 2021



Fonte: Adaptada de WHO (2022).

No Brasil, em 2021 foram notificados 1.683 casos novos de LVH, com uma taxa de incidência de 0,8 casos/100.000 habitantes. A autoctonia da doença foi confirmada em 24 Unidades Federativas nas cinco regiões brasileiras, sendo 46,05%

dos casos da região Nordeste. A doença, acomete principalmente adultos jovens, na faixa etária de 20 a 50 anos, do gênero masculino. As crianças menores de cinco anos foram os responsáveis por 19,5% do total de casos. A taxa de letalidade foi de 10,5%, sendo a mais elevada dos últimos 10 anos. O registro de coinfeção *Leishmania*/HIV chegou a 14,9% no ano de 2021 e, apesar do maior número de casos serem confirmados na região Nordeste, houve aumento do registro de coinfectados em outras regiões, principalmente no Norte e Sudeste (BRASIL, 2022).

No estado de Santa Catarina, no ano de 2019, segundo a Diretoria de Vigilância Epidemiológica (DIVE) foram notificados 22 casos de LT e dois casos não autóctones de LVH (GOVERNO DE SANTA CATARINA, 2020).

Em relação a LVC, desde 2010 até setembro de 2022, foram confirmados, no Estado de Santa Catarina, 1.080 casos entre autóctones e importados, distribuídos em 49 municípios. No entanto, apenas o município de Florianópolis é considerado endêmico, segundo a Nota Informativa Conjunta N° 0010/2022. Em Florianópolis, desde 2010 até o mês de junho de 2020, foram registrados 697 cães sororreagentes (GOVERNO DE SANTA CATARINA, 2020).

É notória a magnitude da LVC e sua correlação com LVH, ainda mais quando se sobrepõe ao problema a coinfeção *Leishmania*/HIV. Em Santa Catarina no ano de 2021 foram notificados 1990 casos de HIV, 78,3% na faixa etária de 20 a 49 anos sendo 65% de predominância no gênero masculino (GOVERNO DE SANTA CATARINA, 2023). Embora o perfil dos pacientes coinfectados por *Leishmania*/HIV não seja diferente daqueles com LVH clássica, a maior letalidade desta coinfeção aponta para a necessidade de estruturação dos serviços de prevenção e de vigilância em saúde (COURA-VITAL et al., 2014, LIMA et al., 2018).

1.4 PATOGENIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

1.4.1 Desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro direcionada a *Leishmania* spp.

O controle do sistema imune frente à infecção por *L. infantum* tanto na LVH como na LVC requer o equilíbrio entre as respostas inflamatória e regulatória. O perfil da resposta imune pode desencadear um padrão de resistência ou suscetibilidade

durante a infecção do parasito, resultando em diferentes formas clínicas da doença (SOULAT; BOGDAN, 2017). A infecção por *Leishmania* spp. é mediada por uma complexa rede de parâmetros imunológicos, que incluem a resposta imune inata e adaptativa. A resposta imune desempenha um papel importante na cura clínica da doença ou em sua progressão (JERONIMO et al., 2007).

Ao efetuar o repasto alimentar no hospedeiro mamífero, o inseto vetor lesiona a derme e deposita a forma promastigota metacíclica, juntamente com sua saliva. Esse processo recruta células residentes, macrófagos dérmicos, queratinócitos, células dendríticas e células de Langerhans (KIMA, 2007; FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012) para o local criando um ambiente pró-inflamatório (SOULAT; BOGDAN, 2017).

Dentre as populações celulares efetoras da imunidade inata estão os neutrófilos que possuem como principal função o reconhecimento e fagocitose para controle de microrganismos invasores (REGLI et al., 2017). A rápida infiltração de neutrófilos no local da picada, propicia sua infecção e em seguida são fagocitados por macrófagos e/ou células dendríticas, podendo migrar para outros locais, iniciando a disseminação (VAN-ZANDBERGEN et al., 2004; CHAVES et al., 2020).

Os macrófagos são células que possuem receptores fagocíticos, os quais permitem que o parasito possa ser fagocitado, onde se transforma, multiplica e estabelece a infecção. Existe uma complexa relação entre o parasito e a célula hospedeira, a qual irá depender dos diferentes mecanismos que o parasito tem para subverter a resposta imune e causar doença, ou que o macrófago ativa para controlar a infecção (CARVALHO et al., 2020).

A LV se caracteriza pela produção de altos títulos séricos de anticorpos anti-*Leishmania* spp. Em humanos, ao que tudo indica, a ativação policlonal de células B no curso da infecção leva à exacerbação da doença (CONDE et al., 2022), aparentemente, altos níveis de anticorpos não apenas falham em fornecer a proteção ao hospedeiro, mas também podem ser uma forte predição de persistência do parasito no organismo mamífero (GONÇALVES; CHRISTENSEN; MOSSER, 2020). Em vista disso, pode-se ter um elevado título de anticorpos anti-*Leishmania* durante a fase ativa da LV e a consecutiva queda após o tratamento (SHARMA; SINGH, 2009).

Em relação a LVC, a resposta imune adaptativa primária contra o parasito é mediada por linfócitos TCD4 Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ , TNF- α e IL-

2 relacionada ao perfil de resistência a infecção (GONÇALVES; CHRISTENSEN; MOSSER, 2020). Foi demonstrado que em cães assintomáticos, a resposta imune do tipo Th1 é predominante e tem demonstrado seu potencial protetor contra a evolução da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2016; TOEPP; PETERSEN, 2020).

Em contrapartida, a resposta imune TCD4 Th2 é caracterizada pela presença de citocinas anti-inflamatórias e está relacionada à suscetibilidade a LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). Além disso, uma resposta imune humoral leva à produção de altos níveis de anticorpos IgG não específicos, destacando a resposta policlonal de células B característica de suscetibilidade LVC. Ainda não há consenso sobre qual subclasse de IgG está relacionada à resistência ou suscetibilidade na LVC (TOEPP; PETERSEN, 2020). Cães suscetíveis manifestam um padrão comum na progressão dos sinais clínicos e gravidade na progressão da doença onde a maioria das alterações clínico-patológicas se tornam evidentes após 12 meses de infecção (MANZILLO et al., 2013).

Em cães com doença clínica, a hipergamaglobulinemia resulta na deposição de complexos imunes nos rins levando a dano renal e, eventualmente, insuficiência renal (ESCH et al., 2015). A insuficiência renal é uma das causas mais comuns de morte entre cães devido à leishmaniose, sendo que mais de 96% dos cães com LV clínica no Brasil sucumbem à doença renal (PINEDA et al., 2017). Além disso, a ativação excessiva da imunidade humoral pode levar à produção de autoanticorpos como antiactina, antitubulina, fator antinuclear e antitransferrina (GONÇALVES et al., 2019).

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

O diagnóstico da LVC se mostra complexo, uma vez que os sinais clínicos apresentados pelos animais são frequentemente inespecíficos. Logo, o diagnóstico preciso da LVC deve ser realizado pela combinação de exames clínico, parasitológico, sorológico e/ou moleculares (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; 2011).

Para o diagnóstico da infecção canina, como medida de saúde pública, são recomendados os testes sorológicos do tipo imunocromatográfico rápido (TR) como triagem e o ensaio imunoenzimático (ELISA) como teste confirmatório. O TR DPP® leishmaniose canina (Bio-Manguinhos) apresenta sensibilidade e especificidade de

83% e 73% e o ensaio de ELISA 89% e 87%, respectivamente. A confirmação laboratorial de caso soropositivo se dá quando há resultado reagente nos dois testes sorológicos (BRASIL, 2020).

O ensaio de imunofluorescência indireta (IFI), também é amplamente utilizado na rotina clínica, e é considerado o padrão ouro para o diagnóstico sorológico da LVC. Seu ponto de corte universal a partir da diluição 1/40, demonstra sensibilidade variando de 22,2% a 100% e especificidade entre 65% e 100%, dependendo da região geográfica em que o teste é aplicado, ilustrando a falta de consistência nos resultados obtidos entre os diferentes estudos (PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMERO, 2015; MARCONDES; DAY, 2019; RIBEIRO et al., 2019).

Os testes parasitológicos são precisos e definitivos para o diagnóstico da LVC. O diagnóstico conclusivo é a observação direta do parasito na amostra clínica ou a observação do parasito após o isolamento em cultura. As amostras são obtidas por meio de métodos invasivos como aspirados de medula óssea, linfonodos e biópsia de pele (BRASIL, 2020).

Os exames histopatológicos de fragmentos da pele e linfonodos podem ser usados. No entanto, o infiltrado inflamatório encontrado não é específico para o diagnóstico, apenas a observação das formas amastigotas fornece o diagnóstico de positividade. A técnica de imuno-histoquímica pode melhorar a evidência do parasito, pois anticorpos específicos marcados detectam com maior sensibilidade e especificidade as formas amastigotas nos cortes de tecidos (BRASIL, 2020).

O xenodiagnóstico é considerado como o teste mais importante para se mensurar a capacidade do cão em infectar os flebotomíneos, porém, não é um método disponível na rotina (TRAVI et al., 2018; BRASIL, 2020).

Os testes moleculares são atualmente os mais utilizados na prática clínico-veterinária, para confirmar a infecção, quantificar a carga parasitária e com isso propiciar o acompanhamento do tratamento. Essa mensuração tem valor clínico e quando realizado na pele também pode indicar possibilidade de transmissão ao vetor (BRASIL, 2020). A reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou sua variante que permite a quantificação de carga parasitária em tempo real (qPCR) permitem a detecção específica do DNA de *Leishmania* spp. em diferentes amostras clínicas, ambas com alta sensibilidade e especificidade (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; ARONSON et al., 2016).

1.6 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Com a ausência de comprovação de que ocorra uma cura parasitológica da LVC pelo tratamento farmacológico, torna-se necessário o acompanhamento dos animais com estadiamentos sucessivos (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). No Quadro 1 está descrito um esquema de estadiamento clínico, manejo e tratamento de cães infectados considerados sadios ou doentes no Brasil (BRASILEISH, 2018).

Quadro 1 – Estadiamento clínico, manejo e tratamento de cães infectados considerados sadios e/ou doentes no Brasil, segundo recomendação da Brasileish (2018)

Estádios Clínicos	Sorologia (1)	Sinais Clínicos	Resultados laboratoriais	Terapia (2)	Prognóstico
ESTÁDIO I (sem doença)	Positiva com níveis de anticorpos baixos a médios/parasitológico negativo	Ausentes	Sem alterações	Imunoterapia (3) + Imunomodulação (4)	Bom
ESTÁDIO II Sem Doença/Doença leve	Negativa ou positiva com níveis de anticorpos baixos a médios/parasitológico positivo	Sinais clínicos ausentes a leves, como linfadenopatia periférica, dermatite papular	Geralmente sem alterações. Perfil renal normal	Imunoterapia (3) + imunomodulação (4) + alopurinol + miltefosina	Bom
ESTÁDIO III Doença moderada	Positiva com níveis de anticorpos baixos a médios/parasitológico positivo	Sinais do Estádio II, além de outros como lesões dérmicas difusas ou simétricas, onicogribose, dermatite exfoliativa, onicogribose/ulcerações, anorexia, epistaxis, febre, emagrecimento.	Anemia não regenerativa leve, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade do soro (proteínas totais >12 g/dl) oriundos da formação de imunocomplexos, tais como uveíte e glomerulonefrite. Subestádios: a) Perfil renal normal (Creatinina <1,4 mg/dl; RPC <0,5) b) Creatinina <1,4 mg/dl; RPC = 0,5-1.	Imunoterapia (3) + imunomodulação (4) + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da nefropatia e controle PSS	Bom a reservado
ESTÁDIO IV Doença grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos/parasitológico positivo	Sinais do Estádio III sinais originários de lesões por imunocomplexos: vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite.	Alterações do Estádio III, além de DRC no Estádio 1 (RPC >1) ou 2 (creatinina 1,4-2 mg/dl) da IRIS	Imunoterapia (3) + imunomodulação (4) + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Reservado a pobre
ESTÁDIO V Doença muito grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos/parasitológico positivo	Sinais do Estádio IV, além de tromboembolismo pulmonar a síndrome nefrótica e doença renal em estágio final.	Alterações do Estádio IV, além do DRC no estágio III (creatinina 2,1-5mg/dl) e IV (creatinina > 5 mg/dl) da IRIS, ou síndrome nefrótica (marcada proteinúria com RPC >5).	Imunoterapia (3) + imunomodulação (4) + alopurinol + miltefosina. Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Pobre

DRC (doença renal crônica); IRIS (International Renal Interest Society); PSS (pressão sistêmica sanguínea); RPC (razão proteína-creatinina urinárias).

(1): Em cães soronegativos ou com níveis de anticorpos baixos ou médios, a infecção deve ser confirmada por meio de citologia, histologia, imuno-histoquímica e/ou PCR. Níveis altos de anticorpos (aumento de 3-4 vezes acima do ponto de corte ou cut-off pré-estabelecido de um laboratório de referência) são conclusivos para o diagnóstico da Lvc.

(2): Monitorar a cada 4 a 6 meses com exames sorológicos, parasitológicos e/ou moleculares, exames gerais para estadiamento e revisão de tratamento.

(3): Imunoterapia com a vacina LeishTec®: um frasco aos 0, 14 e 28 dias em animais infectados ou dois frascos nos dias 0, 21 e 42, em monoterapia ou associada ao alopurinol, com reforços semestrais.

(4): Imunomodulação com domperidona: 0,5-1 mg/kg duas vezes ao dia por 30 dias.

Fonte: Brasileish (2018).

O sucesso do tratamento das diferentes manifestações clínicas das leishmanioses envolve vários fatores, que compreendem as características genéticas do hospedeiro, a resposta imune e a apresentação clínica da doença; a toxicidade dos medicamentos, longos protocolos de tratamento e as características do parasito (sensibilidade intrínseca das espécies e a presença de fatores de resistência ao medicamento) (ANVERSA et al., 2018).

É importante destacar que a resistência aos medicamentos e a falha terapêutica (FT) não são sinônimos. A FT é um fenótipo clínico que abrange fatores relacionados ao hospedeiro (por exemplo, sistema imunológico do paciente e fatores genéticos), agente infeccioso (por exemplo, resistência a medicamentos, virulência e perfis patogênicos de espécies ou cepas de parasitos), fármacos (por exemplo, farmacodinâmica/farmacocinética), protocolo quimioterápico, entre outros (PONTE-SUCRE et al., 2017; HORÁCIO et al., 2021). Já a resistência a medicamento, está relacionada a um fenótipo do parasito, adquirido a longo prazo de exposição ao fármaco, que conseqüentemente seleciona parasitos que desenvolveram potenciais mutações e/ou alterações genéticas que podem estar relacionadas a diminuição da resposta a um determinado fármaco (PONTE-SUCRE et al., 2017). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos bioquímicos subjacentes à esta resistência em isolados de campo deste parasito (HORÁCIO et al., 2021).

No contexto epidemiológico, para o controle da LVC é preconizada, pelo Ministério da Saúde (MS), a eutanásia (BRASIL, 2014). Esta prática pouco eficaz no controle da LVC não vem sendo aceita pela sociedade civil e discussões a respeito tem se intensificado nas últimas décadas (WERNECK et al. 2010; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013; SEVÁ et al., 2016; SILVA et al., 2017; KAZIMOTO et al., 2018; COSTA et al., 2020).

Desde 2016, o medicamento à base de miltefosina (Milteforan®, Virbac) foi aprovado pelo MS e pelo MAPA para o tratamento da LVC (Nota técnica N° 001/2016 MAPA/MS), proporcionando ao veterinário uma nova abordagem terapêutica (DIAS et al., 2020), sendo o estadiamento da LVC importantíssimo para o prognóstico do tratamento.

Segundo a Secretaria Estadual da Saúde do Estado de Santa Catarina, o tratamento de cães não é uma medida recomendada pelo MS, uma vez que há um entendimento que mesmo tratados e com melhora dos sintomas, os cães se mantêm como reservatórios (GOVERNO DE SANTA CATARINA, 2020). As autoridades

sanitárias ressaltam que o tratamento de cães com LV não se configura uma medida de saúde pública para controle da doença e, portanto, trata-se única e exclusivamente de uma escolha do proprietário do animal e de caráter individual (GOVERNO DE SANTA CATARINA, 2020).

As bases terapêuticas para as abordagens e manejo da LVC no Brasil estão distribuídas, segundo o BrasiLeish (2018) e Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), na introdução da imunoterapia (vacina), uso de imunomoduladores (domperidona), medicamentos leishmanicidas (alopurinol e miltefosina) e medicamentos associados.

No momento não existem vacinas registradas para utilização como imunoterapia e sim como abordagem preventiva, sendo recomendada somente para cães não reagentes para leishmaniose. Caso o profissional veterinário opte pelo seu uso com essa finalidade (uso *off label*) deverá obter o consentimento por escrito do tutor, e obrigatoriamente, associá-la à administração de um medicamento leishmanicida registrado no MAPA (BRASIL, 2020). No entanto, estudos científicos, bem como o grupo BrasiLeish (2018) e o CFMV traz a imunoterapia como uma abordagem viável para o tratamento de cães doentes por ter a imunidade mediada por células como o principal mecanismo de defesa contra *L. infantum* (TRAVI; MIRÓ, 2018; BRASIL, 2020).

A domperidona (Motilium[®], Leishguard[®] ou o medicamento genérico) é um agente imunoestimulante, seja em monoterapia ou em combinação com medicamentos leishmanicidas, é recomendada em medicina veterinária como agente profilático ou imunoterápico, uma vez que induz aumento do nível sérico de prolactina que é considerada uma citocina pró-inflamatória que estimula a imunidade celular de linfócitos CD4 Th1 (GÓMEZ-OCHOA, 2009; TRAVI; MIRÓ, 2018a).

O estudo desenvolvido em cães, utilizando a miltefosina para o tratamento da LVC, relatou uma melhora clínica medida por meio da redução na carga parasitária, evidenciada pelo qPCR da pele. Além disso, mostrou uma redução na infectividade de *L. infantum* para flebotomíneos mensurada via xenodiagnóstico em cães tratados, durante o período de observação de 90 dias (NOGUEIRA et al., 2019). Estes resultados contribuíram para a introdução da miltefosina no programa de controle da LVC em áreas de transmissão no Brasil (BRASIL, 2016b).

A miltefosina – hexadecilfosfocolina- (Impavido[®], Zentaris[®]) (Quadro 1) é um agente antitumoral de administração oral descoberto em 1980 que apresentou

atividade antiparasitária contra várias espécies de parasitos (MOHEBALI et al., 2007). A miltefosina pertence à classe de medicamentos alquilfosfocolina, que são ésteres de fosfocolina de álcoois alifáticos de cadeia longa. Do ponto de vista funcional, este fármaco é considerado um inibidor da alquilfosfocolina PI- 3-kinase e Akt (também conhecida por proteína B quinase). Ambas as proteínas são cruciais dentro da via de sinalização intracelular, envolvidas na sobrevivência de células humanas (DORLO et al., 2012). Embora o mecanismo de ação da miltefosina não seja totalmente compreendido, vários estudos apontaram para alterações no metabolismo dos fosfolipídios, prejuízo do metabolismo bioenergético e a indução de apoptose (DORLO et al., 2012; TURNER et al., 2015; BASMACIYAN; CASANOVA, 2019).

O alopurinol, que é um análogo das purinas ou pirazolopirimidinas, cujo mecanismo de ação consiste na formação do ribonucleotídeo trifosfato de 4-aminopirazolopirimidina, um análogo altamente tóxico do ATP, que é incorporado ao RNA do parasito, alterando sua síntese proteica e inibindo sua multiplicação, consequentemente levando-o a morte (KOUTINAS et al., 2001). Esse efeito inibitório foi demonstrado *in vitro*, e por isso, acredita-se que o seu efeito *in vivo* seja mais leishmaniosstático do que leishmanicida. Sua associação com outros fármacos parece proporcionar um efeito sinérgico, minimizando a ocorrência de recidivas (RIBEIRO et al., 2018). No entanto, a resistência a este fármaco em isolados de *L. infantum* oriundos de cães que apresentaram recidivas quando em tratamento, levanta a preocupação com o tratamento em longo prazo (YASUR-LANDAU et al., 2016).

A associação de miltefosina com alopurinol vem demonstrando melhores resultados tanto clínicos quanto na redução da ocorrência de recidivas (DIAS et al., 2020; OLÍAS-MOLERO et al., 2021). Estudos realizados em cães com LVC demonstraram altas taxas de recuperação e prevenção da evolução da doença clínica, assim como diminuição da carga parasitária, através da utilização de métodos como qPCR e xenodiagnóstico (NOGUEIRA et al., 2019). Novas sequências de tratamento podem ser indicadas na ocorrência de recidivas, identificadas nas reavaliações realizadas pelo médico-veterinário responsável pelo tratamento a cada 4 a 6 meses (BRASIL, 2020).

No presente momento, as expectativas relacionadas a terapias combinadas de medicamentos a fim de reduzir a dosagem e o tempo de tratamento e assim, melhorar a tolerância e a conformidade do medicamento já disponíveis no mercado, são altas. Portanto, a busca de novas terapias ou alternativas contra as diferentes

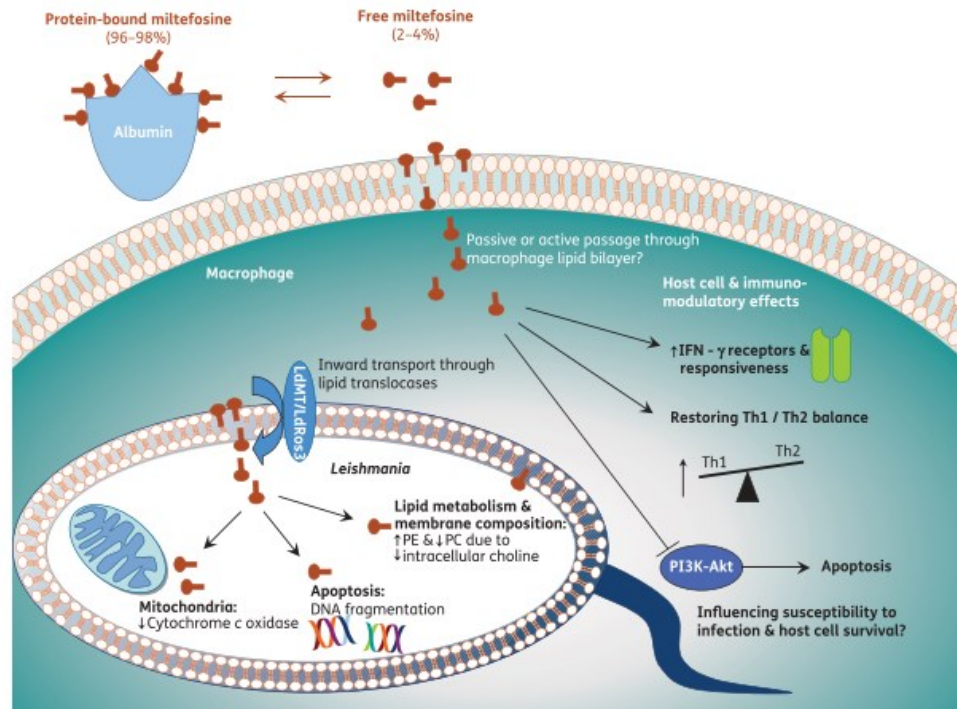
formas da leishmaniose continua sendo uma prioridade clínica (MÉNEZ et al., 2006; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

1.8 MECANISMO DE AÇÃO E RESISTÊNCIA À MILTEFOSINA

Embora o mecanismo de ação da miltefosina não seja totalmente compreendido (Figura 4), estudos sugerem que o fármaco pode reduzir a biossíntese de fosfatidilcolina (PC), afetando a biossíntese de fosfolípidios (PL) por inibir parcialmente a enzima fosfatidiletanolamina metiltransferase que é responsável por converter a fosfatidiletanolamina (PE) em PC causando um aumento de PE na membrana do parasito e conseqüentemente uma diminuição de PL (RAKOTOMANGA et al., 2007; BIBIS, 2014).

Além disso, a miltefosina inibe a enzima mitocondrial citocromo C oxidase de *Leishmania* spp., levando a um decréscimo de consumo de oxigênio e diminuição dos níveis de ATP, prejudicando a função mitocondrial. Estudos de outros autores, mostraram que a miltefosina induziu também em promastigotas de *L. donovani* a morte celular por processo similar a apoptose, além de efeitos imunológicos e inflamatórios em macrófagos (VERMA; DEY, 2004; LUQUE-ORTEGA, 2007; CAPELA; MOREIRA; LOPES, 2019). A homeostase do cálcio também pode ser alterada, bem como causar uma diminuição nos *pools* de aminoácidos, enquanto causam um aumento nos níveis de esfingolípídios (SL) e esteróis (ARMITAGE, 2018).

Figura 4 – Imagem representativa do mecanismo de ação da miltefosina em *Leishmania* spp.



Mecanismo de ação proposto para o fármaco miltefosina contra as formas amastigotas intracelulares do parasito *Leishmania* spp. dentro do macrófago durante a leishmaniose. PC: Fosfatidilcolina.
Fonte: Adaptado de Dorlo et al. (2012)

Parasitas tratados com miltefosina mostraram uma maior quantidade de colesterol do que os parasitos não tratados, sugerindo que a miltefosina pode promover a absorção de colesterol (PARREIRA DE AQUINO et al., 2021). Outros estudos mostraram que a miltefosina interfere na síntese das proteínas específicas de *Leishmania* spp., como a fosfolipase e a proteína C quinase (LUQUE-ORTEGA; RIVAS, 2007). É sabido também que a ação metabólica desse fármaco pode afetar a biossíntese de glicolipídios e glicoproteínas de membrana do parasito, causando apoptose, além de inibir a biossíntese do receptor de Glicosilfosfatidilinositol (GPI), que é a molécula chave para a sobrevivência intracelular de *Leishmania* spp. (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; BASMACIYAN; CASANOVA, 2019).

Estudos vem mostrando que a captação de miltefosina por *Leishmania* spp. é realizada pelo transportador amino fosfolipídio translocase de miltefosina do tipo *P* ATPase (um membro da subfamília P4 de ATPases), também conhecido por LMT e por uma subunidade β não catalítica de LMT denominada de LRos3, um membro da família Lem3/CDC50. Ambas as proteínas estão localizadas, principalmente, na membrana plasmática da *Leishmania* e são necessárias para a rápida captação

intracelular da miltefosina. Estas proteínas, LMT e LRos3, formam um complexo estável que facilita a translocação de fosfolipídios dos locais exoplasmáticos para os locais citoplasmáticos da membrana plasmática do parasito (PÉREZ-VICTORIA; CASTANYNS; GAMARRO, 2003; PÉREZ-VICTORIA et al., 2006a).

Segundo revisado por Pálic et al (2019) a miltefosina, além de agir diretamente sobre o parasito, ela atua na modulação da resposta imune do hospedeiro direcionando a produção de citocinas envolvidas na resposta do tipo Th1, a qual controla a infecção por *Leishmania*.

O conhecimento experimental do mecanismo de resistência a miltefosina em *Leishmania* spp. está limitado a defeitos na internalização da miltefosina, translocação defeituosa, bem como o aumento do efluxo deste fármaco (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006a; TURNER et al., 2015). Estudos anteriores desenvolvidos na espécie de *L. donovani*, revelaram a presença de vários pontos-chave de mutações nos genes LMT e Ros3 que contribuem para o fenótipo de resistência à miltefosina, acarretando uma diminuição significativa da captação deste fármaco (SÁNCHEZ-CAÑETE et al., 2009; BHANDARI et al., 2012; COELHO et al., 2012; MISHRA; SINGH, 2013; KULSHRESTHA et al., 2014; MONDELAERS et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2017).

Outro mecanismo descrito *in vitro*, é o mediado pela superexpressão de genes que codificam glicoproteínas transportadoras do tipo ABC, principalmente a superexpressão do gene ABCG4 em *L. infantum*, no qual a glicoproteína se localiza na bolsa flagelar onde participa ativamente no efluxo de fosfatidilcolina, alquil-glicerofosfocolina e derivados de fosfocolina (CASTANYNS-MUÑOZ et al., 2007) e do gene que codifica a glicoproteína ABCG6, localizada na membrana plasmática do parasito e que também utiliza como substrato os fosfolipídios, alquilfosfolipídios e aminoquinolinas para seu transporte ativo do citoplasma para a região exoplasmática do parasito (CASTANYNS-MUÑOZ et al., 2008). Ao que tudo indica, este aumento na expressão destes genes está associado a um aumento da resistência a vários análogos de alquil-lisofosfolipídeos. Os parasitos que superexpressaram os genes ABCG4 ou ABCG6 tiveram um aumento no efluxo da miltefosina, conferindo um fenótipo de resistência ao fármaco em *Leishmania* spp. (COELHO, 2016; PONTE-SUCRE et al., 2017).

O SbIII é um medicamento transportado passivamente para as células de *Leishmania* spp. por meio da aquagliceroporina 1 (AQP1), uma porina que também permite o transporte de água, glicerol, ureia, diidroxiacetona, metilglioxal e polióis. O

SbIII é de fato um mimetizador químico de substratos naturais de AQP1, tendo uma conformação e carga semelhantes ao glicerol. AQP1 desempenha um papel importante na regulação do volume celular e homeostasia em *Leishmania* spp. (MONTE-NETO et al., 2015). O transportador AQP1 está presente na bolsa flagelar e no flagelo de formas amastigotas e promastigotas, respectivamente (FIGARELLA, et al., 2007). Foi relatado que as aquagliceroporinas (AQPs) facilitam a absorção de metaloides e mantêm a viabilidade do parasito após os desafios osmóticos, sendo o mecanismo de resistência natural ao antimônio mediado pelo menor acúmulo do fármaco ativo no parasito, pois o parasito restringe a entrada de Sb (III) diminuindo a expressão de AQP1 que é um canal de captação do fármaco (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006b). Ao contrário do observado para o Sb (III), os parasitos resistentes à miltefosina apresentaram a expressão do transportador AQP1 aumentada (KULSHRESTHA et al., 2014).

Em 2018 foi identificada uma região no genoma de cepas de *L. infantum* isoladas de pacientes com LV no Brasil, denominada de *locus* de Sensibilidade à miltefosina (MSL), localizado no cromossomo 31 (o único cromossomo estável dentro do mosaicismo aneuplóide). Este *locus* contém 4 genes, dois distribuídos em duplicata e em *tandem* LinJ.31.2370 e LinJ.31.2380, que codificam proteínas putativas 3'-nucleotidase/nuclease. O gene LinJ.31.2390 é um gene de cópia única sem parálogos fora do cluster e que codifica para uma proteína semelhante à helicase, enquanto LinJ.31.2400 (que codifica para 3,2-trans-enoil-CoA isomerase, precursor mitocondrial putativo), tem um parálogo a montante do MSL (LinJ.31.2320). Neste estudo, os autores observaram que cepas isoladas de pacientes com LV que continham deleção dos genes presentes no MSL apresentavam um risco de 9,4 vezes maior na falha do tratamento destes pacientes com à miltefosina (CARNIELLI et al., 2018).

Em contraponto a estes estudos, a pesquisa desenvolvida por Espada et al. (2021) na qual investigou a suscetibilidade de 73 isolados de *L. infantum* oriundos de humanos e de cães de diferentes regiões geográficas do Brasil, usando formas amastigotas intracelulares e promastigotas, mostrou que não houve variação entre o perfil de suscetibilidade dos isolados, bem como não verificaram correlação entre a presença do locus MSL e o perfil de resistência. O estudo desenvolvido por Ferreira et al. (2022), no município de Embu Das Artes, estado de São Paulo, utilizando isolados de *L. infantum* de cães, mostrou a ausência do *locus* MSL e baixa suscetibilidade *in vitro* à miltefosina.

Um mecanismo alternativo de resistência à miltefosina em *L. donovani* envolve a supressão da morte celular programada induzida por estresse oxidativo. Parasitos resistentes à miltefosina permanecem protegidos da perda do potencial de membrana mitocondrial induzido pela miltefosina, além de se protegerem da perda gradual de ATP e da liberação do citocromo C da mitocôndria para o citosol (RAKOTOMANGA; SAINT-PIERRE-CHAZALET; LOISEAU, 2005).

Além disso, há uma expressão aumentada dos genes FeSODA e SIR2, envolvidos na morte celular apoptótica associada ao estresse oxidativo. Dessa forma, acredita-se que a maquinaria do sistema redox remove mais eficientemente os ROS, com isso diminuindo o estresse oxidativo e inibindo a apoptose (MISHRA; SINGH, 2013). Além disso, Carnielli et al (2022) mostraram que cepas de *L. infantum* isoladas de pacientes com recaída após tratamento com miltefosina, tiveram uma maior capacidade de controlar o acúmulo de óxido nítrico no interior de macrófagos.

Estudo desenvolvido com cepas resistentes à miltefosina em *L. donovani* revelaram mutações em genes da piridoxina quinase e proteína α -adaptina, bem como uma regulação aumentada e diminuída de genes específicos associados ao estresse, a composição da membrana, do metabolismo de aminoácidos e folatos (RAKOTOMANGA; SAINT-PIERRE-CHAZALET; LOISEAU, 2005; PONTE-SUCRE et al., 2017).

Fernandez-Prada et al. (2018), utilizando triagem Cos-Seq de alto rendimento com formas amastigostas intracelulares de *L. infantum*, verificaram um novo gene LinJ.32.0050 envolvido na resistência à miltefosina específico da forma amastigota intracelular. Este gene codifica para SEC13, um suposto complexo de proteína de revestimento II (COPII) que está envolvido no tráfego de vesículas lipídicas do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi.

Fatores intrínsecos do fármaco também podem contribuir para a disseminação de parasitos resistentes à miltefosina como: o longo tempo de tratamento, em média 28 dias; a elevada meia vida plasmática (150-200 horas), a qual desencadeia níveis subterapêuticos por algumas semanas após o tratamento; e pontos do mecanismo de ação, como a internalização do fármaco (GÓMEZ PÉREZ et al., 2016; PONTE-SUCRE et al., 2017). Tomados em conjunto, essas informações sugerem que a resistência a miltefosina parece ser um processo multifatorial (PONTE-SUCRE et al., 2017).

1.8 VACINA PARA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Acredita-se que a vacinação bem-sucedida seja uma das principais estratégias para o controle da leishmaniose. Há esforço internacional para o desenvolvimento de uma vacina multiespécies de *Leishmania*. Até o momento, devido à complexidade da resposta imune causada pelas diferentes espécies do parasito, não há vacinas aprovadas para uso humano, logo, a pesquisa e o desenvolvimento ainda estão em andamento (GILLESPIE et al., 2016). Já para uso em cães, até o momento, a única vacina regulamentada, no Brasil é a Leish-Tec[®], do laboratório CEVA, licenciada no ano de 2007, e que está indicada apenas para a prevenção da doença e deve ser usada somente em cães assintomáticos, com resultados sorológicos negativos (BRASIL, 2020).

De modo geral, as vacinas para a profilaxia da leishmaniose que estão em estágio de desenvolvimento, podem ser divididas em três categorias: (i) vacinas vivas atenuadas contra *Leishmania* spp., incluindo novas cepas geneticamente modificadas; (ii) vacinas de parasitos mortos consistindo em parasito morto inteiro ou frações do parasito; e (iii) vacinas definidas, proteínas recombinantes, vacinas de DNA e suas combinações (SRIVASTAVA et al., 2016).

Outras abordagens para o desenvolvimento de vacinas, é a vacinologia computacional baseada em imunoinformática que tem permitido projetar vacinas multiepítipo compreendendo epítomos imunodominantes previstos de múltiplas proteínas antigênicas. Esta metodologia envolve o mapeamento de epítomos de células B e T imunodominantes em uma proteína antigênica, analisando seu potencial imunogênico, fundindo-os com ligantes apropriados e medindo sua capacidade de se ligar a receptores de células hospedeiras, indicando uma nova ferramenta para o desenvolvimento de vacina (SAHA, et al., 2022).

1.9 PROTEOMA EM LEISHMANIA

As abordagens proteômicas tornaram-se ferramentas importantes para entender como as interações hospedeiro-patógeno afetam o resultado das infecções. A proteômica é uma abordagem baseada em espectrometria de massa que fornece uma medição indireta de proteínas por meio da análise de peptídeos derivados da

digestão proteolítica de proteínas intactas (VERAS; MENEZES, 2016; ASLAM et al., 2017; NEGRÃO et al., 2019a).

Inicialmente, o mapeamento proteômico foi baseado na proposta de O'Farrell (1975) que consiste na utilização de géis de poliacrilamida para separar proteínas pelo seu ponto isoelétrico em primeira dimensão e, posteriormente, separá-las pela sua massa molecular na segunda dimensão (2DE). A superação desta técnica, em parte, surgiu com o desenvolvimento da técnica de eletroforese diferencial (DIGE) baseado principalmente na mobilidade diferencial em 2D ou eletroforese em Gel Diferencial (DIGE) o que permite a comparação de duas ou três amostras proteicas simultaneamente em um mesmo gel, sendo a análise e quantificação dos peptídeos feita por diferentes técnicas de espectrometria de massa (ÜNLÜ; MORGAN; MINDEN, 1997; CAPELLI-PEIXOTO et al., 2019).

Outra abordagem utilizada em proteômica que permite a análise de amostras complexas, é a análise denominada de proteômica de *shotgun*, na qual o extrato proteico não é pré-fracionado por gel, sendo diretamente submetido à digestão enzimática, seguida da separação dos peptídeos por cromatografia líquida (LC). Esta técnica permite a quantificação absoluta e relativa de proteínas. Utilizando essa abordagem, o peptídeo (e, portanto, a quantificação de proteínas), pode ser obtida por meio de técnicas com ou sem marcação. A utilização de marcadores é limitada pelo custo dos reagentes, marcação ineficiente e dificuldade na análise de peptídeos de baixa abundância (HUANG et al., 2015; ASLAM et al., 2017).

Nos tripanosomatídeos a expressão gênica é regulada em nível pós-transcricional (LAHAV et al., 2011), por possuírem características moleculares como a transcrição policistrônica que gera como resultado, uma falta de controle transcricional (KARAMYSHEVA; GUARNIZO; KARAMYSHEV, 2020). Dessa forma, os níveis de mRNA possuem uma fraca correlação com a abundância de proteínas por eles codificados, além de não informar sobre as modificações pós-traducionais adicionadas a cadeia proteica, que podem mudar drasticamente a funcionalidade desempenhada pela proteína (PAAPE; AEBISCHER, 2011).

Estudos de proteoma em *Leishmania* spp. tem sido frequentemente realizado com os mais diversos objetivos. Estudos utilizando a técnica de eletroforese diferencial (DIGE), como o desenvolvido por Morales et al. (2008), avaliaram formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani* e estabeleceram um primeiro repertório de fosfoproteoma nesta espécie. Além disso, identificou fosfoproteínas envolvidas na

resposta ao estresse e choque térmico, turnover de RNA/proteína, metabolismo e sinalização sugerindo que o fosfoproteoma possa ser constitutivo.

Yao et al. (2010) realizaram uma análise proteômica de membrana plasmática de formas promastigotas de *L. infantum* na tentativa de compreender a maior virulência das formas metacíclicas. Proteínas relacionadas ao estresse, bem como de transporte de prótons e nutrientes foram exclusivamente identificadas em promastigotas na fase logarítmica de crescimento; da mesma forma, cinco fatores de virulência de *Leishmania* spp. já bem caracterizados foram exclusivos da fração de membrana das formas infectantes.

Outro estudo desenvolvido por Pescher et al. (2011), que comparou amastigotas axênicas e amastigotas oriundas de hospedeiros mamíferos de *L. donovani*, revelou diferenças significativas entre esses parasitos no que diz respeito à sobrevivência intracelular e infecção do animal, as quais estão aparentemente ligadas à expressão de enzimas necessárias para resistência antioxidante e crescimento em condições nutricionais de privação.

Costa et al. (2011) compararam proteínas diferencialmente expressas entre amastigotas e promastigotas de *L. infantum*, associando a técnica de 2DE e Western Blot, utilizando soro de cães identificaram proteínas antigênicas nessa espécie. Pires et al. (2014) encontraram que a virulência em de *L. infantum* está associada as proteínas KMP-11 e metalopeptidase, que se correlacionam com a melhora na eficiência na interação parasito-hospedeiro e degradação de proteínas e peptídeos de proteção do hospedeiro, respectivamente.

Hassani e Olivier (2013) realizaram o proteoma de exossomos liberados por macrófagos murinos não infectados e infectados com *L. mexicana* ou estimulados com lipopolissacarídeos (LPS). Quarenta e quatro proteínas foram exclusivamente encontradas nos exossomos infectados e pela primeira vez a proteína de superfície GP63 de *L. mexicana* foi identificada em exossomos liberados de macrófagos J774 expostos a promastigotas em fase estacionária. Foi possível também notar que a infecção com o parasito e a estimulação com LPS modulam de maneira semelhante a abundância de proteínas compartilhadas por ambos os grupos nos exossomos dos macrófagos.

Já Magalhães et al. (2014) demonstraram que o cultivo *L. amazonensis*, por um longo período, também pode levar à perda de infectividade das promastigotas axênicas. Além disso, foi possível identificar, que proteínas envolvidas com a

infectividade do parasito, como triparedoxina peroxidase, metalopeptidases, HSP70 e dissulfeto isomerase, tiveram abundância progressivamente reduzida durante os 150 dias de cultivo.

Carnielli et al. (2014) observaram que a maioria das proteínas reguladas positivamente na análise do proteoma de isolados de *L. infantum* resistentes à miltefosina foram associados com homeostase do mecanismo de redox, resposta ao estresse, proteção à apoptose e translocação do fármaco. Estas proteínas, diferencialmente expressas, estão provavelmente envolvidas na resistência natural à miltefosina e que, provavelmente, o mecanismo de resistência em *Leishmania* spp. é multifatorial.

A proteômica de *shotgun* e a quantificação por LC/MS têm sido utilizadas para desvendar a biologia de *Leishmania* spp. e sua interação com o hospedeiro. No estudo desenvolvido por Tsigankov et al. (2013) foi avaliado o fosfoproteoma de promastigotas e amastigostas axênicas de *L. donovani*, revelou proteínas com múltiplos sítios de fosforilação estágio-específica. Os autores sugerem que a fosforilação atua como etiqueta de reconhecimento de estresse ativando respostas celulares.

Menezes et al. (2013) mostraram, por meio de proteômica *shotgun*, que *L. major* e *L. amazonensis* modulam proteínas envolvidas no metabolismo celular durante os eventos iniciais da interação *in vitro* com macrófagos oriundos de camundongos CBA. De acordo com os autores, na infecção por cada uma das espécies, ocorre um agrupamento de determinadas proteínas possivelmente responsáveis pelas diferentes formas de respostas fenotípicas dos macrófagos, levando assim, ao controle da infecção na célula parasitada por *L. major* e à sobrevivência de *L. amazonensis*.

O estudo desenvolvido por Negrão et al. (2017), avaliou as alterações no lipidoma após infecção *in vitro* de macrófagos por *L. infantum* e *L. amazonensis*. Neste estudo, *L. infantum* apresentou maior conteúdo de fosfatidiletanolamina do que a *L. amazonensis*, o que pode justificar as diferenças nas manifestações clínicas desencadeadas por cada espécie. Também foi observado que as fosfatidilserinas são consideradas importantes classe de lipídeos para a forma intracelular do parasito. Estes resultados revelam classes de lipídeos que podem estar envolvidos nas vias de visceralização e diferenciação do parasito.

Negrão et al. (2019a) efetuaram a quantificação relativa de proteínas específicas de três diferentes espécies de *Leishmania* infectando macrófagos por meio da técnica de “*Label free*”. Neste estudo, os resultados revelaram que a infecção por *Leishmania* spp. diminui proteínas de macrófagos envolvidas nas vias de apoptose enquanto regula positivamente as proteínas de ativação de fagócitos e o acúmulo de lipídeos.

Beneke et al. (2019) utilizando a técnica de “*Label free*” geraram uma lista de mais de 300 proteínas flagelares, e acoplando a técnica de nocaute via CRISPR-Cas9 produziram uma biblioteca de 100 linhagens de leishmania mutantes, sendo 56 mutantes de *L. mexicana* com alterações flagelares (52 reduzidas e 4 aumentadas), observando-se pela primeira vez, alteração na velocidade de motilidade de promastigotas. O vetor *Lu. longipalpis* foi submetido a infecção com estes mutantes e foi observado que os promastigotas não atingiram as regiões anteriores do trato digestório do flebotomíneo. Esses dados mostraram que *L. mexicana* precisa de motilidade direcional para uma colonização bem-sucedida no inseto vetor.

Montoya et al. (2019) utilizando análise proteômica “*Label free*” identificou 12 proteínas diferencialmente expressas em lesões, destacando-se as proteínas ligadoras de cálcio A2, A8, e A9 e subunidades de hemoglobina alfa-2 e delta, as quais apresentaram alta correlação com o desenvolvimento epidérmico e resposta imunológica na redução da inflamação e aumento do reparo tecidual, demonstrando serem potenciais biomarcadores para monitoramento precoce de recuperação na resposta à terapia da LC.

Pinho et al. (2020) por meio da análise da proteômica “*Label Free*” de três espécies de *Leishmania* (*L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*), responsáveis pelo maior número de casos de LT identificaram cerca de 7.000 proteínas. A análise da abundância de proteínas dos processos metabólicos energéticos permitiu evidenciar diferenças entre as espécies e sugere que esses parasitos dependem de substratos energéticos distintos para obter ATP. Além disso, forneceram dados quantitativos sobre diferentes proteínas de membrana, transportadores e lipídios, todos os quais contribuem para diferenças específicas entre as espécies.

Saboia-Vahia et al. (2022) utilizando análise proteômica “*Label free*” analisaram a proteômica quantitativa comparativa baseadas em MS das formas promastigotas da cepa MHOM/BR/1974/PP75 de *L. infantum* induzida a resistência *in*

vitro à miltefosina e selvagem, mostrando uma remodelação de componentes da membrana e da mitocôndria, com aumento significativo nos complexos de fosforilação oxidativa, particularmente no complexo IV e ATP sintase, acompanhada de aumento do metabolismo energético dependente, principalmente, da β -oxidação de ácidos graxos nas cepas resistentes. Além disso, foram detectadas alterações na abundância de proteínas envolvidas na resistência à miltefosina, como transportadores ABC e ATPase de transporte de fosfolipídios.

Trabalhos utilizando etiquetas isobáricas para análise proteômica em *Leishmania* spp. ou sua interação com o hospedeiro vem sendo publicados. Sardar et al. (2013) avaliaram o efeito individual e combinado de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na abundância de proteínas nas formas promastigotas de *L. donovani*. Vinte por cento do proteoma predito para a espécie foi detectado e a abundância de um quarto destas proteínas estavam alteradas após a exposição aos agentes estressantes. As principais alterações foram observadas na maquinaria enzimática das vias envolvidas, na manutenção da homeostase redox, metabolismo da tripanotona, fosforilação oxidativa, metabolismo do superóxido, processo de respiração mitocondrial e outras vias metabólicas essenciais.

Negrão et al. (2019b) utilizando abordagem proteômica baseada em MS e marcação de *tag* de massa em tandem, investigaram *in vitro* a modulação de proteínas em macrófagos murinos e biópsias de pele após exposição a *Leishmania* spp. (*in vivo*). As infecções induzidas por *L. amazonensis* e *L. major* apresentaram várias proteínas que foram alteradas após a infecção fornecendo candidatos interessantes para uma investigação mais aprofundada sobre o mecanismo da doença e o desenvolvimento de possíveis imunoterapias.

O estudo de Brotherton et al. (2014) utilizou proteômica quantitativa com marcação de isótopos estáveis de aminoácidos em cultura de células (SILAC) para caracterizar proteínas citoplasmáticas e de frações de membranas de parasitos de *L. infantum* resistentes a Anfotericina B *in vitro*. No total, 97 proteínas individuais foram encontradas diferencialmente expressas pela cepa resistente. Dentre estas, as proteínas envolvidas nas vias energéticas, como a glicólise e o ciclo do ácido tricarbóxico (TCA). Curiosamente, muitas proteínas envolvidas na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteínas de choque térmico também foram reguladas positivamente pela cepa resistente.

Lynn, Marr e McMaster (2013) utilizaram iTRAQ para avaliar alterações na abundância de proteínas da fração de membrana de formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e *L. mexicana*. Algumas centenas de proteínas foram identificadas em cada espécie, incluindo proteínas de membrana diferencialmente expressas envolvidas na motilidade, metabolismo e infectividade como os fatores de virulência eEF-1 α , amastina e GP63 e identificação de novas proteínas de membrana com potencial alvo terapêutico.

O estudo de quantificação proteica por iTRAQ realizado por Singh et al. (2015), comparou os perfis de expressão de proteínas de células de linhagem monocítica humana (THP-1) infectadas ou não com *L. donovani* e detectou indícios de que o parasito reprograma o metabolismo celular da célula infectada. Dentre as alterações relatadas, destaca-se o aumento na abundância de proteínas envolvidas na transcrição, *splicing* de RNA, reparo e replicação do DNA.

Outro estudo utilizando iTRAQ foi realizado por Losada-Barragán et al. (2019), analisou como a desnutrição proteica altera as proteínas secretadas envolvidas na resposta imune à infecção por *L. infantum*. Para tanto, avaliaram o perfil proteômico do líquido intersticial do baço em camundongos desnutridos infectados com *L. infantum*. Este trabalho revelou que a desnutrição induziu a redução significativa de moléculas quimiotáticas e pró-inflamatórias, bem como de proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos nucleicos e aminoácidos, indicando um microambiente proliferativo prejudicado. Conseqüentemente, uma diminuição significativa na expressão de Ki67 foi observada, sugerindo que a proliferação de esplenócitos está comprometida em animais desnutridos.

Fialho-Junior et al. (2021) utilizando as técnicas de DIGE e de etiquetas isobáricas para análise proteômica de proteínas diferencialmente presentes nas formas amastigotas e promastigotas de cepas distintas de *L. infantum* observaram que na forma amastigota da cepa mais virulenta (BH400), havia um grande grupo de proteínas relacionadas à glicólise, choque térmico e proteínas ribossômicas, enquanto na forma promastigota, o grupo de proteína encontrado consistia em resposta ao estresse, choque térmico e proteínas ribossomais. Além disso, os processos biológicos relacionados às vias metabólicas, ribossomos e fosforilação oxidativa foram enriquecidos na cepa mais virulenta (BH400). Foi também observado que proteínas ribossomais, HSP70, enolase, frutose 1,6-bifosfato aldolase, peroxidoxina e

triparedoxina peroxidase que desempenham papel importante na infecção por *L. infantum*, mostraram-se aumentadas na cepa virulenta (BH400).

O estudo proteômico permite identificar pequenas diferenças na abundância de proteínas e conhecer modificações pós-traducionais, as quais têm papel importante na modulação das funções proteicas e principalmente na resposta imune à leishmaniose (YAO et al., 2010; LOSADA-BARRAGÁN et al., 2019).

Considerando que as cepas isoladas de cães incluídos neste estudo foram obtidos antes e após o tratamento *in vivo* com miltefosina, a realização das análises das características biológicas, da comparação da suscetibilidade *in vitro* frente a miltefosina, do padrão de transcrição gênico relacionado a pressão seletiva da miltefosina e análise proteômica, podem fornecer um panorama global do comportamento fenotípico e genotípico destas cepas permitindo a busca por padrões para o monitoramento de perfis de resistência *in vivo* e a descobertas de novos alvos terapêuticos em *L. infantum*.

2 JUSTIFICATIVA

Em Santa Catarina, a transmissão autóctone da LVC foi inicialmente comprovada em 2010 no bairro da Lagoa da Conceição, no município de Florianópolis (FIGUEIREDO et al., 2012; STEINDEL et al., 2013). Atualmente, o município de Florianópolis é considerado endêmico para LVC, havendo transmissão ativa da doença em mais de 12 bairros do município com cerca de 700 animais comprovadamente infectados, o que aliado aos registros de transmissão de LVC no Oeste do Estado de SC, evidenciam o padrão de expansão da doença (FLORIANÓPOLIS, 2021).

A ocorrência de três casos humanos autóctones no município de Florianópolis a partir de 2017 demonstra que mesmo na ausência do vetor clássico, *Lu. longipalpis*, a transmissão para humanos vem ocorrendo com baixa intensidade (GOVERNO DE SANTA CATARINA, 2017).

Considerando a magnitude da LV como problema de saúde pública, a ausência de vacina para uso humano, a expansão e urbanização da doença em diferentes regiões do país, o papel relevante do cão doméstico como reservatório do parasito, a limitada eficácia de proteção da vacina disponível para cães aprovada no MAPA, o tratamento clínico da LVC utilizando a miltefosina com relatos de falha

terapêutica associado as limitadas metodologias disponíveis para o seu controle, tornam relevante a realização de estudos acerca do parasito no sentido de gerar informações novas para o desenvolvimento de ferramentas e estratégias de monitoramento que possam mitigar o problema e busquem o bem-estar da população canina e humana.

3 HIPÓTESE

As cepas isoladas de cães naturalmente infectados no município de Florianópolis, SC, antes e após o tratamento com Milteforan[®], apresentam variações nas características biológicas, no perfil de transcrição de genes associados a suscetibilidade à miltefosina e uma abundância diferencial de proteínas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as características biológicas *in vitro*, a transcrição de genes associados a suscetibilidade à miltefosina e o proteoma total das cepas de *L. infantum* isoladas de cães no município de Florianópolis, antes e após o tratamento com Milteforan[®].

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e comparar o perfil das curvas de crescimento *in vitro* de formas promastigotas das cepas de *L. infantum* isoladas de cães;
- Determinar a infectividade *in vitro* das cepas de *L. infantum* isoladas de cães frente as células THP-1;
- Determinar a CI₅₀ da miltefosina nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares das cepas isoladas de cães;
- Avaliar quantitativamente a transcrição de genes relacionados a suscetibilidade à miltefosina nas cepas de *L. infantum* isoladas de cães;
- Avaliar qualitativamente e quantitativamente o proteoma das cepas de *L. infantum* isoladas de cães;

- Realizar a predição de epítomos lineares específicos de células B das proteínas encontradas no proteoma das cepas de *L. infantum* isoladas de cães;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

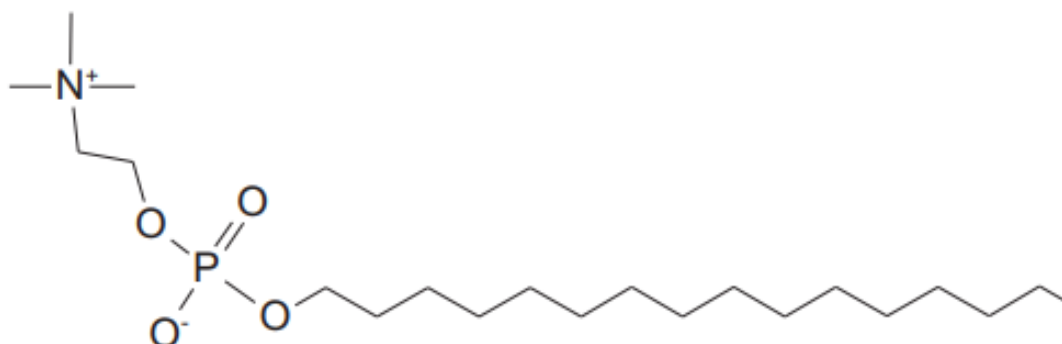
5.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Todos os procedimentos para coleta de amostras biológicas nos animais realizaram-se de acordo com as normas e regulamentos do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) e o projeto foi aprovado pelo CEUA da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o número nº 6251290719.

5.2 PROPRIEDADES DO FÁRMACO

A miltefosina (Hexadecilfosfocholina), CAS 58066-85-6 e CID: 3599, foi adquirida da Cayman Chemical, com pureza $\geq 98\%$, e foi diluída em DMSO puro (MERCK) na concentração de 0,888 mg/mL ou 2mM. Aliquotas de 50 μ L foram preparadas e armazenadas em freezer à -20 °C, protegidas da luz (Figura 5).

Figura 5 – Estrutura química da miltefosina



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A análise *in silico* do fármaco miltefosina (Tabela 1) foi realizada usando o servidor online Molinspiration (2022) (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) e o SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#>) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Tabela 1 – Propriedades moleculares de miltefosina calculadas pelo programa com servidor online Molinspiration (2022) e SwissADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017)

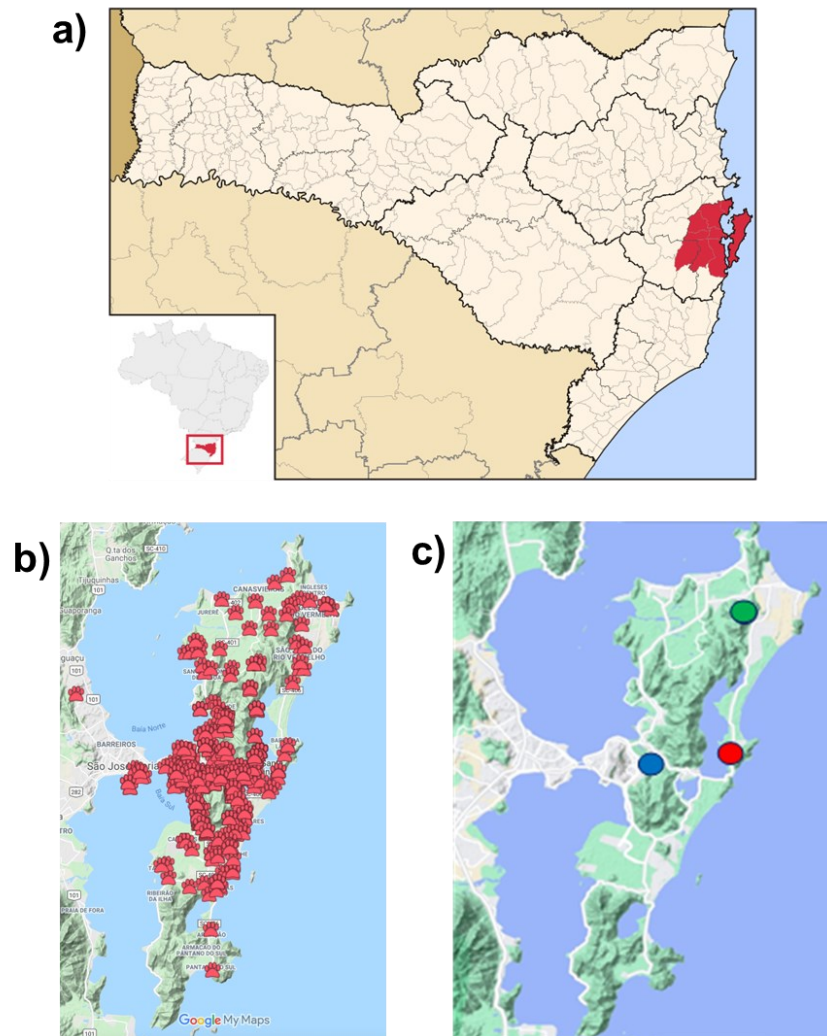
Propriedades	Dados
PM (g/mol)	407.58
MiLogP	- 0,21
HBA	27
HBD	5
TPSA (Å ²)	58,60
nRotB	20
Lipinski's Violation	0
Volume Molecular (Å ³)	432.32
Absorção GI	Baixo
Log S ^(a) (SILICOS-IT) ^(b)	Pouco solúvel

***PM**: peso molecular; **MiLogP**: coeficiente de partição octanol / água; **HBA** (nON): número de aceptor de ligações de hidrogênio aceitadores de ligação de hidrogênio ou não de átomo de oxigênio e nitrogênio; **HBD** (nOHNH): número de doadores de ligações de hidrogênio ou número de ligações NH, OH; **TPSA**: área de topológica de superfície; **nRotB**: número de ligações rotativas; **GI**: gastrointestinal. (a): **Método utilizado para calcular solubilidade - escala de log S**: insolúvel < -10; < pouco solúvel < -6; moderately < -4; solúvel < -2; muito solúvel < 0; < altamente solúvel. (b) **SILICOS-IT**: Método de fragmentação calculado por FILTER-IT, programa versão 1.0.2.
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

5.3 ÁREA DE ESTUDO

O município de Florianópolis situa-se na região Leste do estado de Santa Catarina, nas coordenadas (27° 35' 49" S e 48° 32' 58" W). A cidade apresenta uma estimativa populacional de aproximadamente 516.000 habitantes, estendendo-se por uma área de 674,844Km². Florianópolis é a capital do Estado e possui uma área continental e uma área insular, tendo como cidades vizinhas o município de São José, Palhoça e Biguaçu (IBGE, 2022). O Município é considerado endêmico para LVC, tendo casos ativos em praticamente todos os bairros da cidade (Figura 6).

Figura 6 – Distribuição geográfica do Estado de Santa Catarina, município de Florianópolis, bairros onde cães com LVC já foram notificados e região insular de Florianópolis onde os cães deste estudo residem



(a) Mapa do Brasil com destaque em vermelho do Estado de Santa Catarina e Mapa de Santa Catarina com destaque em vermelho os municípios da grande Florianópolis e Florianópolis (área continental e ilha) (CAMPOS, 2006); (b) Mapa de Florianópolis ((área continental e ilha) mostrando em destaque os casos de LVC distribuídos por bairros (patas vermelhas) (BRASIL, 2022; GOVERNO DE SANTA CATARINA, 2020); (c) Mapa de Florianópolis mostrando em destaque os bairros que residem os cães, dos quais foram isolados os parasitos deste estudos. Círculo azul: representa Bairro da Barra da Lagoa (cão Jack), círculo vermelho bairro Itacorubi (cão Otto) e círculo verde representa o bairro Vargem do Bom Jesus (cão Tchopo) (ROSAR, 2022).

5.4 CARACTERÍSTICAS DOS CÃES

Os isolados foram obtidos a partir de coletas de aspirado de linfonodo poplíteo no tempo T0, antes do início do tratamento e T1, 3 dias após o final do tratamento com miltefosina. Os isolados foram denominados de acordo com as normas da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) seguidas do nome do cão e o tempo de isolamento: MCAN/BR/2020/JACK_T0, MCAN/BR/2020/JACK_T1,

MCAN/BR/2020/OTTO_T0, MCAN/BR/2020/OTTO_T1 e MCAN/BR/2020/TCHOPO_T0, MCAN/BR/2020/TCHOPO_T1. O diagnóstico dos cães foi comprovado pelo método de *imprint*, isolamento do parasito na cultura, sorologia e qPCR da biópsia de pele (ROSAR, 2022).

O cão Jack, macho, sem raça definida, 5 anos de idade, 19 Kg, residente no bairro Itacorubi, foi tratado por 28 dias com Milteforan® (Virbac) na dosagem 2 mg/kg, lote: 8D1056921. O tratamento foi associado com o fármaco alopurinol (15mg/kg) por 30 dias e domperidona (1,1mg/kg) e Ômega 3 1.000mg/dia de forma contínua. A coleta do T0 foi na data de 21/04/2020 e T1 **na data de** 21/07/2020.

O cão Otto, macho, SDR, 7 anos de idade, 39 Kg, residente no bairro Barra da Lagoa, foi tratado por 28 dias com Milteforan® (Virbac) na dosagem 2 mg/kg, lote: CW5SK690. A coleta do T0 foi na data de 08/09/2020 e T1 na data de 27/10/2020.

O cão Tchopo, macho, da raça boxer, 1,3 ano de idade, 32Kg, residente no bairro Vargem do Bom Jesus, foi tratado por 28 dias com Milteforan® (Virbac) na dosagem 2 mg/kg, lote: HL95EW06. O tratamento foi associado com o fármaco alopurinol na dosagem de 15mg/kg de forma contínua. A coleta do T0 foi na data de 19/10/2020 e T1 **na data de** 20/11/2020. Na Tabela 2 mostra os dados clínico-epidemiológicos dos cães de acordo com o banco de dados do Laboratório de Protozoologia da UFSC.

Tabela 2 – Dados epidemiológicos dos cães utilizados neste estudo

Cães	Isolados	Raça	Peso (Kg)	Sexo	Carga parasitária/mg de tecido	Redução da carga parasitária (%)	Estadiamento T0	Estadiamento T1
Jack	T0	SDR	19	Macho	791.608	99,96%	III	II
	T1		21		334			
Otto	T0	SDR	39	Macho	19.185	72,60	II	II
	T1		38,45		5.257			
Tchopo	T0	Boxer	32	Macho	57.821,296	93,91	III	II
	T1		33		3.521,316			

*SDR: sem raça definida. qPCR: Reação em cadeia de polimerase quantitativa. T0: isolado antes do início do tratamento com miltefosina. T1: isolado após 3 dias do término do tratamento com miltefosina. Kg: quilo grama de peso. (%): percentual. Carga parasitária: quantidade de cópias de parasitos/mg de tecido. Estadiamento T0 e T1: realizado de acordo com recomendações do Brasileish (2018) (Quadro-1).

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

5.5 PARASITOS E CÉLULAS

5.5.1 Origem dos parasitos e células

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados seis isolados de *L. infantum* de três cães descritos no item 5.3. Estes isolados foram registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob número de cadastro C83648C com a seguinte nomenclatura das cepas: MCAN/BR/2020/JACK_T0, MCAN/BR/2020/JACK_T1, MCAN/BR/2020/OTTO_T0, MCAN/BR/2020/OTTO_T1, MCAN/BR/2020/TCHOPO_T0 e MCAN/BR/2020/TCHOPO_T1, doravante neste estudo serão denominadas cepas: JACK_T0, JACK_T1, OTTO_T0, OTTO_T1, TCHOPO_T0 e TCHOPO_T1. Como cepa referência foi utilizada a MHOM/BR/1974/PP75, denominada cepa PP75 e a linhagem monocitária humana (ATCC® TIB 202TM) denominada THP-1. Todos os parasitos e células estão criopreservadas no banco do Laboratório de Protozoologia da UFSC. Para a identificação no texto e nas figuras as cepas foram nomeadas JACK_T0, JACK_T1, OTTO_T0, OTTO_T1, TCHOPO_T0, TCHOPO_T1 e PP75 quando tratadas com miltefosina *in vitro* a nomenclatura se deu JACK_T0 Mil, JACK_T1 Mil, OTTO_T0 Mil, OTTO_T1 Mil, TCHOPO_T0 Mil, TCHOPO_T1 Mil e PP75 Mil.

5.5.2 Cultivo dos parasitos e das células THP-1

Promastigotas foram cultivados a 26 °C em tubos de 50 mL contendo 35 mL de meio Schneider (Sigma-Aldrich), pH 7,4, suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal inativado (SBF – Gibco, BRL), 5% (v/v) de urina humana masculina, 10 U/mL penicilina e 10 µg/mL estreptomicina (Gibco, BRL), aqui denominado Schneider completo e repicados em intervalo de 3 a 4 dias. Várias alíquotas foram congeladas em nitrogênio líquido e depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia da UFSC. Para os experimentos, os parasitos foram utilizados até a 5ª passagem, quando então uma nova alíquota foi descongelada e cultivada.

As células THP-1 foram cultivadas a 37 °C, 5% de CO₂ em garrafa de 75 cm², contendo 12 mL de meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich)

suplementado com 10% de SBF (Life Technologies®), 2 mM de Glutamax (Sigma-Aldrich), 1mM piruvato de sódio (Gibco®), 10 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina (Gibco®), denominado de meio RPMI completo e repicadas semanalmente. Para os experimentos, as células foram utilizadas até o 10º subcultivo, quando então uma nova alíquota foi descongelada e cultivada.

5.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA CEPAS DE *L. INFANTUM* ISOLADAS DE CÃES

5.6.1 Caracterização molecular dos isolados de *Leishmania infantum* de cães antes e após o tratamento com miltefosina

Para a confirmação da espécie dos seis isolados, as formas promastigotas dos parasitos foram submetidos a extração do DNA genômico utilizando o kit Qiagen (Qiagen®) conforme instrução do fabricante. Amostras de DNA foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação da região HSP70, cujo tamanho do fragmento amplificado é de cerca de 1.300 pb.

As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 20 µl utilizando 10 ng de DNA; 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP); 10 pmol de cada iniciador HSP70-F (5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA3') e HSP70-R (5' CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3') e 1U de GoTaq® DNA polimerase (Promega®) em tampão específico (GARCIA et al., 2004).

O DNA foi desnaturado a 94 °C por 5 minutos e amplificado com 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 61 °C por 1 minutos e 72 °C por 3 minutos, seguido por um último ciclo a 72 °C por 10 minutos para extensão final. Para confirmar as espécies o DNA de cepas padrão de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M-2904) e *L. infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) foram utilizados como controles positivos. Como controles negativos foram utilizadas reações sem a presença de DNA.

Três µL de cada produto de amplificação foram resolvidos em gel de agarose a 1,5%, corado por brometo de etídio e gravados digitalmente. Após foi efetuada a precipitação do produto de PCR com isopropanol e suspensos em 5 µL de água. O DNA foi submetido a digestão com a enzima de restrição de *HaeIII* (New England Biolabs) em um volume final de 10 µL contendo 1,5 µL de tampão de reação 10 X

(New England Biolabs NEBuffer 2), 2,5 µL de água ultrapura e 1 µL da enzima de restrição e incubado a 37°C por 12 horas, conforme instruções do fabricante. Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e corados com nitrato de prata.

5.6.2 Curva de crescimento dos parasitos

Para a curva de crescimento, 2×10^5 parasitos/mL foram cultivados em tubo Falcon® de 15mL contendo 5 mL de meio Schneider (Sigma-Aldrich) completo em triplicata. O crescimento parasitário foi analisado pela contagem diária dos parasitos em câmara de Neubauer por 10 dias. Os valores de tempo de duplicação (TD), refletem o tempo em horas necessário para a duplicação da população celular e a taxa de crescimento (TC), reflete o número de divisões por unidade de tempo (horas), ambos foram calculados utilizando dados da curva de crescimento. Para os cálculos foram utilizados a concentração inicial de parasito no tempo inicial e o tempo final obtidos para cada cepa no final da fase logarítmica e início da fase estacionária, utilizado o Programa *Doubling Time* v 3.1.0 (ROTH, 2006). Os resultados foram submetidos à análise estatística, sendo que diferenças com valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

5.6.3 Infecção *in vitro* de células THP-1 pelas cepas de *L. infantum*

A infecção das células THP-1 com as cepas JACK_T0, JACK_T1, OTTO_T0, OTTO_T1, TCHOPO_T0, TCHOPO_T1 e a cepa PP75 de *L. infantum* foi avaliada após 24, 48, 72 e 96 h. As células THP-1 foram cultivadas em estufa à 37 °C por 72 h em placas de 24 orifícios sobre lamínulas circulares de vidro de 13 mm (2×10^5 células/poço) contendo 0,5 ml de RPMI completo e incubadas na presença de 100 ng/ml de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich) para diferenciação em macrófagos. Após este período as células foram infectadas com as formas promastigotas de 3° dia de cultivo das cepas. Para tanto, as formas promastigotas foram opsonizadas com soro humano B+ por 1 h à 37 °C. A seguir, os parasitos foram lavados e suspensos em meio RPMI 1640 sem soro. A proporção de parasito/célula de 30:1 foi utilizada para a infecção da cultura celular por 4 h à 37 °C, em 5% CO₂.

Os promastigotas das cepas foram analisados a partir de esfregaços em lâmina e corados pelo Giemsa para determinação do percentual de promastigotas metacíclicos pela contagem de 200 parasitos/esfregaço (objetiva 100X) em microscópio óptico.

Após o período de infecção celular, os parasitos livres foram removidos após três lavagens com PBS pH 7,02, em seguida 0,5 mL de meio RPMI completo foi adicionado a cada poço e as células cultivadas em diferentes tempos em estufa à 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Após cada tempo, as lamínulas foram retiradas, sendo as células fixadas em metanol e coradas pelo corante Panótico (Laborclin, Paraná, Brasil). Os ensaios foram realizados em triplicata uma única vez.

O percentual de células infectadas, o número de parasito por célula infectada e o total de parasito em 200 células foi determinado pela contagem microscópica de 200 células/ lamínula (objetiva 100X). O índice de infecção (IF) foi determinado pela multiplicação da média do número de amastigotas por célula infectada e pela percentagem de células infectadas (LONARDONI; RUSSO; JANCAR, 2000).

Os valores de tempo de duplicação (TD), refletem o tempo em horas necessário para a duplicação da população celular. A taxa de crescimento (TC) reflete o número de divisões por unidade de tempo (horas), ambos foram calculados utilizando os valores de amastigotas por célula THP1 infectada. Para os cálculos foram utilizados o número de amastigota por THP1 infectada no tempo inicial (24 horas) e no tempo final (72 horas), utilizado o Programa *Doubling Time* v 3.1.0 (ROTH, 2006).

5.6.4 Avaliação da atividade leishmanicida da miltefosina nas formas amastigotas de *L. infantum*

Para tanto, as células THP-1 foram cultivadas em estufa à 37 °C por 72 horas em placas de 24 orifícios sobre lamínulas circulares (2×10^5 células/poço) contendo 0,5 mL de RPMI completo na presença de 100 ng/mL PMA (Sigma-Aldrich) para diferenciação em macrófagos. Promastigotas de *L. infantum* das cepas JACK_T0, JACK_T1, OTTO_T0, OTTO_T1, TCHOPO_T0, TCHOPO_T1 e PP75, obtidos no terceiro dia de cultivo foram lavados com PBS pH 7,4 e opsonizados em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro humano B+ inativado e incubados à 37 °C, atmosfera de 5% de CO₂. A seguir, as células THP-1 foram infectadas com os parasitos numa proporção 30:1 parasito: célula por 4 h à 37 °C, em 5% de CO₂.

Paralelo a isso, para as cepas efetuou-se esfregaços em lâmina e foram coradas com a coloração de Giemsa e o percentual de promastigotas metacíclicos foi determinado pela contagem microscópica (objetiva 100X).

Após este período, os parasitos não aderidos ou não internalizados foram removidos por uma lavagem com PBS pH 7,4. Em seguida 0,5 mL de meio RPMI completo foi adicionado a cada poço e as células cultivadas por 24 horas em estufa à 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. As células foram tratadas com miltefosina (Cayman Chemical) nas seguintes concentrações: 15µM, 5µM, 1,67 µM, 0,56 µM, 0,18 µM, como controle positivo foi utilizado 8 µM do fármaco Anfotericina B e como controle negativo foi utilizado DMSO 1%, o experimento foi efetuado em triplicata. As placas foram então incubadas no tempo de 72 h em estufa à 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂.

Ao final de cada tempo, as lamínulas foram retiradas, fixadas com metanol e coradas com Panótico. A avaliação da atividade leishmanicida foi realizada pela contagem microscópica de 200 células/ lamínula (objetiva 100X) para determinação do número de células infectadas, o número de amastigotas/célula e o IF.

Os valores foram expressos como percentual de inibição de amastigotas intracelulares (PI - AI) e percentual de inibição de índice de infecção (PI - IF) os quais foram calculados utilizando a fórmula (1) e fórmula (2).

$$PI_{AI} = 100 - \left(\frac{T}{C} \times 100 \right) \quad (1)$$

Onde,

T é a média do total de amastigotas intracelulares em células tratadas;

C é a média do total de amastigotas intracelulares em células do controle negativo.

$$PI_{IF} = 100 - \left(\frac{T}{C} \times 100 \right) \quad (2)$$

Onde,

T é a média do total do índice de infecção das células tratadas;

C é a média do total do índice de infecção das células do controle negativo.

Os valores de CI_{50} foram estimados a partir das médias dos valores do PI_AI e PI_IF obtidos em triplicata por interpolação gráfica utilizando o programa *GraphPad Prism 8.0.2*. Os resultados foram submetidos à análise estatística com valores de $p < 0,05$ considerados significantes.

5.6.5 Avaliação da atividade leishmanicida da miltefosina nas formas promastigotas das cepas de *L. infantum*

Em placas de 96 orifícios, os promastigotas de *L. infantum* das cepas JACK_T0, JACK_T1, OTTO_T0, OTTO_T1, TCHOPO_T0, TCHOPO_T1 e PP75, obtidos no terceiro dia de cultivo, foram distribuídos na concentração de $0,54 \times 10^6$ parasitos por poço em 180 μ L de meio *Schneider* completo. Em seguida, os parasitos foram tratados com 20 μ L do fármaco miltefosina nas concentrações finais de: 20 μ M, 15 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1,25 μ M e 0,625 μ M e com o fármaco anfotericina B (Sigma-Aldrich) nas concentrações finais que variaram de 2 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M, 0,25 μ M, 0,125 μ M, 0,0625 μ M e 0,03125 μ M. Como controle positivo foi utilizado 8 μ M do fármaco Anfotericina B e como controle negativo foi utilizado somente DMSO 1%. As placas foram incubadas por 43 horas em estufa à 26 °C e então, foi adicionado 20 μ L de Resazurina (Sigma-Aldrich) na concentração de 250 μ g/mL em todos os poços da placa e mantidos por mais 5 horas em estufa à 37 °C. A fluorescência foi lida a 530nm de excitação e 590 nm de emissão de filtro em espectrofotometro Tecan® Modelo *Infinite M200* (TADELE et. al., 2021). Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes.

Os valores de CI_{50} foram estimados a partir dos valores médios obtidos de triplicata de dois experimentos independentes, por interpolação gráfica utilizando o programa *GraphPad Prism 8.0.2*. Os resultados foram submetidos à análise estatística com valores de $p < 0,05$ considerados significantes.

5.6.6 Avaliação da citotoxicidade da miltefosina em células THP-1

As células THP-1 foram diferenciadas em placas de 96 orifícios (12×10^4 células/poço) contendo 180 μ L de meio RPMI completo na presença de 100 ng/mL PMA (Sigma-Aldrich) e incubadas em estufa à 37 °C em atmosfera de 5% CO_2 por 72 horas. As monocamadas foram tratadas em triplicata com 20 μ L de miltefosina nas

concentrações finais: 20µM, 10µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM 0,625 µM e 0,31,25 µM. Como controles positivo e negativo, respectivamente foi utilizado o DMSO 50% e 1%. As placas foram incubadas por 67 h em estufa à 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂, sendo em seguida adicionado 20µL de Resazurina à 250µg/mL e mantidas por 5 horas em estufa à 37 °C. A fluorescência foi lida a 530nm de excitação e 590 nm de emissão de filtro em espectrofotometro Tecan® Modelo *Infinite M200* (TADELE et. al., 2021).

Os valores de CC₅₀ foram estimados a partir dos valores médios obtidos das triplicatas de dois experimentos independentes, por interpolação gráfica utilizando o programa *GraphPad Prism 8.0.2*. Os resultados foram submetidos à análise estatística e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. O índice de seletividade da miltefosina foi calculado através do valor de CC₅₀ determinada nas células THP1 dividido pelo valor da CI₅₀ das formas promastigotas e amastigotas utilizando a fórmula (3).

$$\text{Índice de Seletividade (SI)} = \frac{\text{CC}_{50} \text{ das células THP1}}{\text{CI}_{50} \text{ formas promastigotas ou amastigotas}} \quad (3)$$

5.6.7 Determinação do percentual de formas promastigotas metacíclicas na cultura

Nos experimentos de infecção e atividade leishmanicida, bem como nos próprios dias de repique para a manutenção dos parasitos, as formas promastigotas de 3° e 4° dia de cultivo das cepas foram analisados a partir de esfregaços em lâmina e corados pelo Giemsa para determinação do percentual de formas promastigotas metacíclicos pela contagem de 200 parasitos por esfregaço em objetiva 100X em microscópio. Os resultados foram submetidos à análise estatística e os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5.6.8 Determinação do índice de especificidade (SPI) da miltefosina

A classificação do índice de especificidade (SPI) permite verificar se o composto é mais ativo na forma promastigota ou amastigota de *Leishmania* spp. O SPI foi calculado pela razão do CI₅₀ da forma promastigota e CI₅₀ da forma amastigota. Os valores de SPI > 2,0 indicam que o composto é mais ativo nas formas amastigotas,

valores SPI < 0,4 sugerem que o composto é mais ativo nas formas promastigotas. Composto com valores de SPI entre 0,4 e 2,0 são considerados ativos em ambas as formas (DON; IOSET, 2014; GOUVEIA et al., 2022).

5.6.9 Fator Z

O Fator Z é o coeficiente que reflete tanto a faixa dinâmica do sinal do ensaio quanto a variação dos dados associada às medições do sinal e, portanto, é adequado para avaliação da qualidade do ensaio. O fator Z é uma característica estatística simples e adimensional para cada ensaio de triagem, o que o torna uma ferramenta útil para comparação e avaliação da qualidade dos ensaios e pode ser utilizado na otimização e validação de ensaios. A qualidade dos ensaios foi determinada pelo fator Z que foi calculado utilizando a fórmula: $1 - [(3DP \text{ do maior valor do controle} + 3DP \text{ do menor valor do controle}) / (\text{média do maior valor de controle} - \text{média do menor valor do})]$. Valor do fator de Z aceitável para os ensaios foi de $\geq 0,5$ (ZHANG; CHUNG; OLDENBURG, 1999; MALO et al., 2006; DOMÍNGUEZ-ASENJO et al., 2021).

5.6.10 Análise estatística da caracterização biológica das cepas de *L. infantum*

Após o preenchimento das planilhas foram montados bancos de dados eletrônicos (EXCEL[®]) que possibilitaram as análises, estas foram realizadas por meio do programa *GraphPad Prism 8.0.2*.

A IC₅₀ e a CC₅₀ foram determinadas pela regressão não linear da curva dose resposta com transformação x para $\log(x)$ e $\log(\text{inhibitor})$ vs *normalized response – variable slope*.

As análises estatísticas dos ensaios foram desenvolvidas utilizando diferentes testes para a comparação de médias nos resultados dos ensaios biológicos. As escolhas dos testes dependeram da análise da distribuição dos dados, avaliando a normalidade destes utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino e *Pearson* e *Shapiro-Wilk*. Dessa forma, os testes paramétricos utilizados neste estudo foram: o Teste *t* (*two-way*) não pareado, a análise de variância múltipla (*two-way ANOVA*) não pareada com teste múltiplo de *Tukey's* ou *Sidak's* e a análise de variância simples (*one-way ANOVA*) com teste múltiplo de *Tukey's*. Quando os dados se apresentavam não paramétricos utilizou-se o Teste de *Wilcoxon* e a correlação de

Spearman. Todos os dados foram submetidos ao teste de outliers de ROUT, e a hipótese nula foi rejeitada quando ($p < 0,05$).

5.7 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE À MILTEFOSINA POR MEIO DA ANÁLISE DE TRANSCRIÇÃO DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE À MILTEFOSINA E SEQUENCIAMENTO GÊNICO DAS CEPAS DE *L. INFANTUM*

5.7.1 Interação das formas promastigotas das cepas *L. infantum* isoladas dos cães na presença ou ausência da miltefosina

Em placas de 6 orifícios, os promastigotas de *L. infantum* das cepas JACK_T0, JACK_T1, OTTO_T0, OTTO_T1, TCHOPO_T0, TCHOPO_T1 e PP75, obtidos no quarto dia de cultivo, foram distribuídos na concentração de 6×10^6 parasitos /poço em 2 mL de meio *Schneider* completo. Três poços de cada placa foram tratados com 0,25% de DMSO e nos outros três poços foram tratados com a CI_{50} de miltefosina previamente determinada contra formas promastigotas de cada cepa JACK_T0 (5,14 μ M); JACK_T1 (4,04 μ M); OTTO_T0 (7,21 μ M); OTTO_T1 (6,85 μ M). TCHOPO_T0 (7,87 μ M), TCHOPO_T1 (6,86 μ M) e PP75 (11,40 μ M). As placas foram incubadas por 48 h em estufa à 26 °C.

5.7.1.1 Coleta das amostras do ensaio e armazenamento

As placas foram incubadas em gelo, em seguida, de cada poço da placa foi retirado 1,5mL de meio contendo os parasitos, lavado duas vezes com PBS pH 7,4 gelado e centrifugados à 5.000 x g por 10 minutos à 4 °C. Ao final o sedimento celular de cada poço foi armazenado à -80 °C até a extração de RNA. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5.7.1.2 Extração, purificação e quantificação do RNA

Para a extração de RNA o *pellet* obtido de cada poço, foi submetido a extração utilizando o Kit PureLink RNA Mini Kit (Ambion®), conforme orientações do fabricante. Ao final, foram eluídos em 50 μ L de água livre de RNase e os tubos foram armazenados em freezer a -80 °C.

5.7.1.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA por transcrição reversa, o RNA total extraído foi quantificado em espectrofotômetro a 230, 260 e 280 nm para ser determinada a concentração do material em ng/ μ L e posterior observação das razões 260/280 e 260/230 nm. Com estes parâmetros considerados satisfatórios, utilizou-se as concentrações de 1 μ g DNA para a obtenção do cDNA. Para cada tubo contendo amostra, foram adicionados tampão da enzima DNase I 1X (Thermo Fisher Scientific), DNase I a 0,1 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific), sendo o restante do volume final de 10 μ L da reação completados com água livre de RNAses. A seguir, cada tubo foi incubado por 30 minutos em equipamento de banho seco à 37 °C e, então, foi adicionado 1 μ L EDTA à 50mM (Thermo Fisher Scientific) e incubado por 10 minutos em temperatura de 65 °C. Adicionou-se 1 μ L OligoDT (Invitrogen) à 50 μ M e 1 μ L de desoxirribonucleotídeos (dNTP) à 10mM, sendo submetido a incubação por 5 minutos a uma temperatura de 65 °C. Após, foram adicionados ao tubo 4 μ L de Tampão de Reação 5X (Thermo Fisher Scientific), 1 μ L de DTT à 0,1M e 0,5 μ L da enzima Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific), o restante do volume de água livre de RNase, totalizando, no final da reação, um volume de 25 μ L. A amostra foi incubada por 30 minutos a uma temperatura de 50 °C em termociclador e a reação foi inativada por 10 minutos a uma temperatura de 80 °C em Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems®).

5.7.1.4 Quantificação da transcrição de genes associados a suscetibilidade à miltefosina por qPCR

A PCR quantitativa em tempo real a partir do cDNA foi utilizada para quantificar a transcrição dos genes relacionados a suscetibilidade à miltefosina das formas promastigotas de *L. infantum*. Os iniciadores com sequências gênicas dos alvos de interesse *LiMT*, *LiABCG6*, *LiRos3*, *LiABCG4*, *AQP1* e gene de referência *GAPDH* estão descritos na Tabela 3. Para as reações dos genes *LiABCG6*, *LiRos3*, *AQP1* e *GAPDH* foi utilizado um volume total de 10 μ L, 2 μ L do cDNA a uma concentração de 100 ng/ μ L, 0,3 pmol de cada iniciador e demais reagentes do kit

GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) seguindo protocolo do fabricante. Para o gene *LiMT* e *LiABCG4* foi utilizado a concentração de 0,5 pmol de cada iniciador.

Tabela 3 – Sequência de iniciadores que foram utilizados no estudo

Gene amplificado	Sequência de nucleotídeos dos iniciadores	Temperatura de ligação	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
GAPDH	5' TACTGAACGACATCCACGCC'3 5' CTAGCACGTACTGCACACCA'3	60 °C	90
ABCG6	5' GAAAGTGAAGCCAGACGGA'3 5' ACACGTTTCAGGCTGATTGCT'3	57 °C	101
ABCG4	5' GCCGTGAACTTTACCTGGGA'3 5' ACACCCGCTGAGGTTGAAAA'3	60 °C	102
AQP1	5'CTGTGTCTTTGGTGCCTTTCC'3 5'GCCTTTTGGGCGTCGTC'3	60 °C	129
LiMT	5'CTGTGGTACGTCTTCGCTCTT'3 5'CGTTCAACTCGGGGTCGTTA'3	57 °C	211
LiROS3	5'CGGCTTGATTTTCGCTACGA'3 5'GGTTGTAGTAGCCGGAGACA'3	56 °C	325

Os iniciadores foram desenhados por Flores, 2021.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Os ciclos de amplificação foram realizados de acordo com as temperaturas e tempos de: 50 °C por 1 minuto, seguido de 95 °C por 10 minutos e então amplificação de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos seguido da temperatura de ligação de cada iniciador por 15 segundos e extensão a 60°C por 15 segundos. A ciclagem será finalizada pela curva de dissociação dos iniciadores, a qual demonstra a temperatura em que metade do produto de qPCR está dissociado e a outra metade hibridado. Como controle negativo foi utilizado água.

5.7.1.5 Cálculo para a obtenção do número de transcritos e valores de transcrição

Para a obtenção dos valores de transcrição foi utilizado o limite de detecção baseado na curva padrão utilizando plasmídeos contendo o inserto de cada gene. Esse método permite visualizar o número de transcrito por ng de RNA de cada cepa.

Foi realizado a normalização utilizando os valores de transcritos do gene de referência GAPDH. Para calcular a modulação dos genes, o número de transcritos de cada gene normalizado foi dividido pelas cepas isoladas de cada cão no tempo T0 considerando valor 1. Os cálculos foram efetuados em grupos de cepas (T0 e T1) tratada e não tratada com miltefosina de cada cão, foi aceito o *fold-change* (FC) > 3 e *p* valor < 0,05.

Para a análise do componente principal (PCA) utilizou-se os valores do número de transcritos por ng de RNA dos genes LiABCG4, LiABCG6, AQP1, LiMT, LiRos3 normalizados com o gene de referência GAPDH de cada cepa tratada e não tratada com miltefosina, os quais foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. As variáveis “genes” (LiABCG4, LiABCG6, AQP1, LiMT, LiRos3) foram validadas utilizando a correlação de *Pearson* ($r < 0,9$) no programa PAST4 v.4.06 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

5.7.2 Preparação das formas promastigotas das cepas de *L. infantum* isoladas dos cães para sequenciamento

As formas promastigotas das cepas JACK_T0, OTTO_T0 e TCHOPO_T0 foram cultivadas a 26 °C em tubos de 50 mL contendo 35 mL de meio Schneider completo por 4 dias. Após os parasitos foram centrifugados à 5.000 x *g* por 10 minutos à 4 °C, lavadas com PBS pH 7,4 por três vezes. Ao final, o sedimento celular de cada tubo foi armazenado à -80 °C.

5.7.2.1 Extração do DNA das cepas de *L. infantum*

O sedimento celular do item 5.7.2 foi submetido a extração do DNA utilizando o kit de purificação DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN®), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. O DNA extraído foi armazenado à -20 °C e enviado para o sequenciamento.

5.7.2.2 Análise das sequências dos genes LiABCG6, LiABCG4, AQP1, LiMT e LiRos3 envolvidos na suscetibilidade a miltefosina das cepas de *L. infantum* isoladas de cães

As sequências nucleotídicas e aminoacídicas correspondentes aos genes ABCG4, ABCG6, LiMT, Aquaporina e LiROS3 foram obtidas na base de dados

TritypDB (<http://tritypdb.org>, v 59) na data 05 de setembro de 2022 para as espécies *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/71973/M2269), *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2904), *L. donovani* (cepas BPK282A1 e CL-SL) e *L. infantum* (cepa JPCM5).

As demais sequências MCAN/BR/2020/ZION_T0; MCAN/BR/2020/MEL_T0; MCAN/BR/2018/PENELOPE; MCAN/BR/2018/PEKA, MCAN/BR/2018/MEG, MHOM/BR/2017/PC, MCAN/BR/2017/JUJU, MCAN/BR/2016/NICK, MCAN/BR/2015/LUMA e MCAN/BR/2010/LOBA utilizadas nos alinhamentos pertencem as cepas de *L. infantum* isoladas em Santa Catarina no período de 2010 a 2020, cujos genomas foram sequenciados e fazem parte de um banco de dados do Laboratório de Protozoologia da UFSC.

Foi realizada a análise das sequências nucleotídicas e aminoacídicas dos genes ABCG4, ABCG6, LiMT, AQP1 e LiROS3 das cepas TCHOPO_T0; OTTO_T0; JACK_T0 juntamente com as outras citadas acima, utilizando-se algoritmos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), a fim de se encontrar similaridades com sequências nucleotídicas (*BLASTN*) e proteicas (*BLASTp*) obtidas do banco de dados (*TritypDB*). As sequências nucleotídicas e aminoacídicas correspondentes a um mesmo gene foram alinhadas no programa *Clustal Omega*. O alinhamento foi gerado para as sequências aminoacídicas e uma matriz de identidade foi gerada para as sequências nucleotídicas.

5.8 ANÁLISE PROTEÔMICA DAS CEPAS *L. INFANTUM* ISOLADAS DE CÃES

5.8.1 Interação das células THP-1 infectadas pelas cepas de *L. infantum* isoladas de cães na presença ou ausência da miltefosina

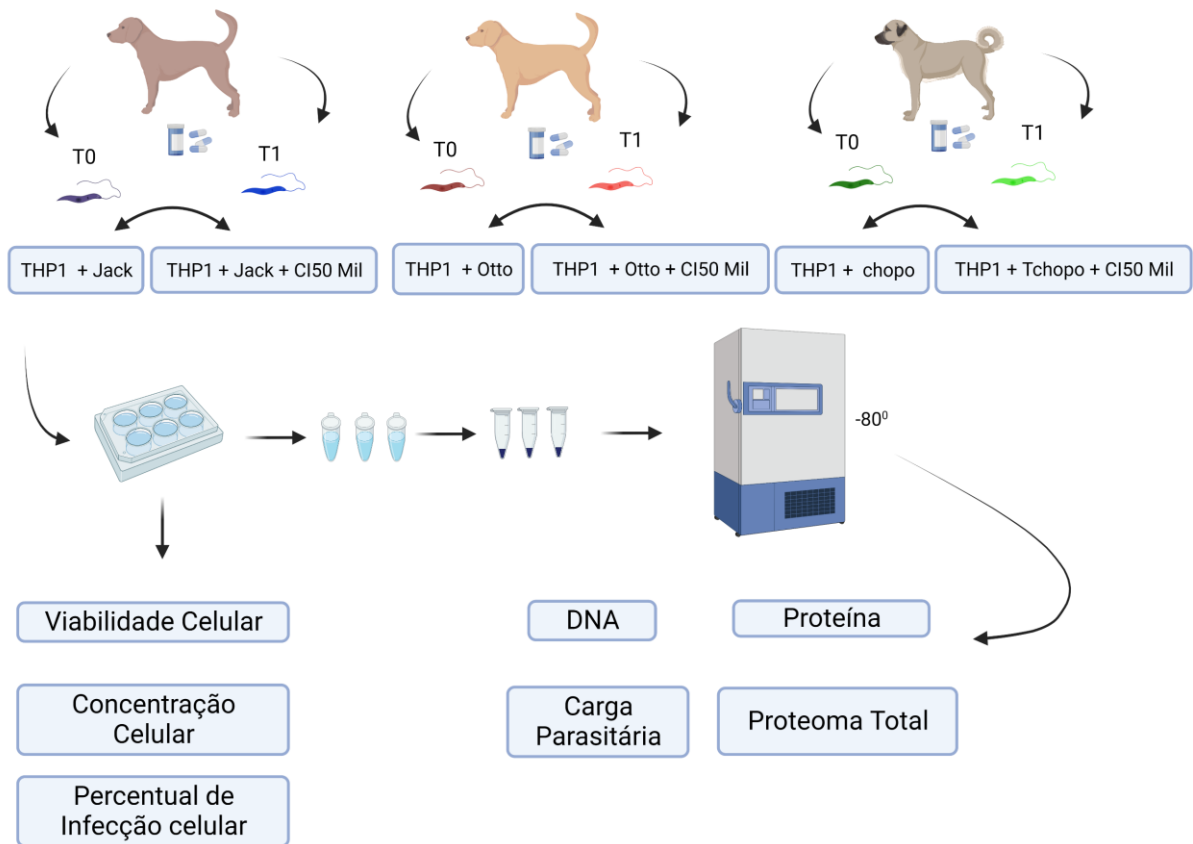
As células THP-1 foram semeadas em placas de 6 poços (4×10^6 células/poço) em 2mL de meio de RPMI completo e incubadas à 37 °C, 5% de CO₂ por 72 horas na presença de 100 ng/mL de PMA para diferenciação em macrófagos. Promastigotas (2×10^5 parasitos/mL) das cepas JACK_T0, JACK_T1, OTTO_T0, OTTO_T1, TCHOPO_T0 e TCHOPO_T1 foram crescidas em meio *Schneider* completo por 4 dias em estufa à 26 °C.

A seguir os promastigotas foram lavados com PBS pH 7,4 e opsonizados em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro humano B+ inativado e incubados

por 1 hora em estufa à 37 °C, em 5% de CO₂. O percentual de promastigotas metacíclicos foi determinado em esfregaços corados e a seguir, as células THP-1 diferenciadas foram infectadas na proporção 30:1 (parasito: célula) por 4 h a 37 °C/5% de CO₂. Após a incubação, os parasitos não aderidos ou não internalizados foram removidos por 3 lavagens com meio RPMI 1640 sem SBF e em seguida, 1 mL de meio completo foi adicionado a cada poço e as placas incubadas por 24 h em estufa à 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, para o desenvolvimento completo das formas amastigotas.

As monocamadas celulares foram tratadas com as concentrações finais de CI₅₀ pré-definidas de miltefosina contra formas amastigotas para cada cepa JACK_T0 (0,81µM), JACK_T1 (1,44 µM), OTTO_T0 (1,52 µM), OTTO_T1 (2,81µM), TCHOPO_T0 (1,35µM) e TCHOPO_T1 (2,10µM) e incubadas por 72h em estufa à 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Como controle foram utilizadas células THP-1 infectadas pelas cepas e tratadas com DMSO 1% e células THP-1 não infectadas foram tratadas com a média das concentrações de CI₅₀ pré-definidas de miltefosina para cada cepa (1,7µM) e tratadas com DMSO 1%. Todos os ensaios foram efetuados em triplicata. Na Figura 7 está demonstrado de forma esquemática o delineamento do experimento.

Figura 7 – Delineamento do experimento de infecção e tratamento com miltefosina



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

5.8.1.1 Coleta das amostras e armazenamento das células THP-1 infectadas pelas cepas de *L. infantum* isoladas de cães

Após a incubação, as placas foram submetidas ao *quenching* metabólico (interrupção imediata da atividade enzimática). Para tanto, as placas foram imersas em banho contendo etanol resfriado com gelo seco por 20 segundos. Em seguida, cada poço da placa foi lavado 2 vezes delicadamente com PBS pH 7,4 gelado. A seguir foi adicionado 1 mL de NaCl 0,9% pH 7,4 gelado e com sucessivas lavagens as células foram descoladas das placas e transferidas para tubos de centrifuga de 1,5mL. Aliquotas de 150 μ L de cada poço foram retirados para determinação da taxa de infecção por citometria de fluxo e para a determinação da viabilidade celular. Os tubos contendo as amostras foram lavados duas vezes com NaCl 0,9% pH 7,4 gelado e centrifugados à 5.000 x g por 10 minutos à 4 °C. Ao final o sedimento celular de cada poço foi armazenado à -80° . Para a extração de proteína foram utilizados dois

sedimentos celulares em triplicata e para a extração de DNA foi utilizado um sedimento celular em triplicata para cada variável do estudo.

5.8.1.2 Determinação da concentração celular em câmara de Neubauer das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães

No final das 96 h do experimento do item 5.8.1 foi determinado o número de células/mL e calculado o percentual de células viáveis. Para tanto, uma alíquota de 10 µL das amostras de cada poço de cada placa do experimento foi pipetada em um tubo de 1,5 mL e efetuado a contagem das células utilizando câmara de Neubauer, na presença do corante vital azul de tripan 0,4%.

5.8.1.3 Quantificação do percentual de infecção das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães utilizando a técnica de citometria de fluxo

Para a quantificação da infecção celular item 5.8.1, uma alíquota de 100 µL da cultura celular infectada ou não infectada com as diferentes cepas, tratadas ou não tratadas com miltefosina, foram transferidos em tubos para citometria juntamente com 1 mL de solução A (PBS pH 7,2) e lavados duas vezes a 1.500 x g por 10 minutos à temperatura ambiente (TA). As células foram então adicionadas de 250 µL da solução B (Paraformaldeído 4% em PBS pH 7,2) e incubadas à 4°C por 10 minutos, lavadas duas vezes em TA com 1 mL da solução C (BSA 1% em PBS pH 7,2) a 1,500 x g por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 1mL da solução D (BSA 0,2%, azida sódica 0,1%, saponina 0,5% em PBS pH 7,2) e após incubação à 4°C por 15 minutos, as amostras foram centrifugadas em TA à 1,500 x g por 5 minutos. Ao sedimento foi adicionado como anticorpo primário 100 µL do soro policlonal humano (*in house*) anti-*Leishmania* diluído 1/200 na solução C e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir as células foram lavadas em 1 mL da solução C, centrifugadas à 1,500 x g por 5 minutos e acrescentado 50 µL do anticorpo secundário anti-humano (Alexa-488-Invitrogen) na diluição de 1/500 na solução C e incubadas à 4°C por 20 min ao abrigo de luz. Após este passo, as células foram novamente lavadas em 1 mL da solução C e adicionadas de 500 µL em solução A para leitura.

Como controles negativos da metodologia, foram utilizados: 100 µL da cultura das células THP-1 sem e com infecção não sendo submetida a adição de anticorpos

primários e secundários e 100 µL da cultura das células THP-1 sem e com infecção incubada com o anticorpo secundário, sem a adição de anticorpo primário. A leitura dos dados foi efetuada utilizando o citômetro de fluxo *FACSCANTO II* (Beckton Dickinson) com aquisição de 10.000 eventos e excitação de 488nm com pico de emissão de 519nm. O percentual de células THP-1 infectadas pelas cepas isoladas de cão quando não tratadas e tratadas com a CI_{50} de miltefosina determinado para cada cepa, se deu pela detecção da população celular (tamanho) e pelo reconhecimento do parasito através da ligação do anticorpo anti-*Leishmania*. Efetuou-se a análise dos dados no programa *FloJow V10*.

5.8.1.4 Estimativa da carga parasitária por qPCR das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães

Para a quantificação da carga parasitária do experimento item 5.8.1, as células infectadas pelas cepas isoladas de cães foram submetidas a extração de DNA utilizando o *PureLink® RNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific) e em seguida realizada a reação de qPCR.

Para a curva padrão foi utilizado o DNA plasmidial contendo como inserto o gene da DNA polimerase α de *Leishmania* spp. e diluído à razão 10 em 8 diluições 10^8 a 10^1 . A técnica é baseada no uso de O fluoróforo BRYT Green® (Promega) utilizado como agente intercalante do DNA como sistema de detecção.

As reações de qPCR foram preparadas com os iniciadores *forward*: 5'-TGTCGCTTGCAGACCAGATG-3' e *reverse*: 5'-GCATCGCAGGTGTGAGCAC-3'`, dirigidos à região conservada do gene DNA polimerase α (GenBank: AF009147) que amplificam um fragmento de 90 pb (BRETAGNE et al., 2001). As reações foram realizadas em volume final de 10 µL contendo 50 ng de DNA, 2,5 pmoles/µL de cada iniciador, 5 µL do tampão GoTaq® qPCR Master Mix 2X (Promega®), 0,1 µL de CRX Reference Dye a 30µM (Promega) e 2,3 µL de água deionizada (Promega®). A placa MicroAmp® foi selada e colocada no equipamento *7900HT Fast Real-Time PCR System* do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), com as seguintes etapas: um ciclo de desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para completa desnaturação, 60 °C por 1 minuto com aquisição da fluorescência neste momento.

Após o período de amplificação, a curva de dissociação foi realizada com uma ciclagem adicional cuja temperatura aumenta de 60 °C a 95 °C a uma taxa de 0,3 °C por segundo, com aquisição de fluorescência contínua.

Para análise final, o limite de detecção foi de 32º ciclo (*cut-off*). Para todas as amostras, foram avaliados parâmetros e resultados, como a curva de dissociação, a intensidade de fluorescência a cada ciclo e a quantificação do número de cópias de DNA conforme a equação estabelecida pela curva padrão. Em seguida, a quantidade de DNA detectada foi convertida em número de cópias do gene de DNA polimerase α por ng de DNA do parasito.

5.8.1.5 Extração, purificação e quantificação das proteínas em solução obtidas das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães

Para a extração, purificação e quantificação das proteínas do experimento item 5.8.1, para cada condição foram adicionados dois sedimentos celulares, a estes foi adicionado um volume final de 110 μ L RapiGest (Waters®) na concentração de 0,2% diluído em tampão de bicarbonato de trietilamônio 50mM (TEAB) (Sigma-Aldrich). Os sedimentos foram submetidos a lise mecânica utilizando seringa de insulina com agulha 30G e submetido a centrifugação a 18.000 $\times g$ à - 4 graus em centrífuga refrigerada (Eppendorf 5430) por 30 min. e as concentrações proteicas determinadas utilizando o ensaio fluorimétrico da plataforma *Qubit Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante. Neste método, é utilizado um fluoróforo e um fluorímetro que quantifica a intensidade de fluorescência presente em cada amostra, que é diretamente proporcional à concentração de proteína da amostra. Para tanto, as amostras foram diluídas duas vezes (1 μ L de proteína total + 1 μ L de água Milli-Q), e em seguida a solução de trabalho (ST) foi preparada. Para cada amostra utilizou-se 199 μ L de tampão + 1 μ L fluoróforo conforme instrução do fabricante, este valor foi multiplicado pela quantidade de amostras a serem dosadas e para as três amostras de cada concentração padrão (curva padrão). Para efetuar a curva de calibração, utilizou-se 190 μ L (ST) + 10 μ L de cada concentração padrão (Padrão 1 = 0 ng/ μ L, Padrão 2 = 200 ng/ μ L e Padrão 3 = 400 ng/ μ L). Para a quantificação proteica das amostras extraídas utilizou-se 199 μ L (ST) + 1 μ L de cada amostra teste. A leitura foi realizada no *Qubit™ 4 Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific) conforme orientação do fabricante.

Após a determinação da concentração de proteína, 100 µg de proteínas de cada condição experimental foi adicionado a um novo tubo e o volume final ajustado para 100µL com 50 mM de TEAB. Em seguida, as amostras de cada condição experimental foram reduzidas com ditioneitol (DTT) na concentração final de 10mM, aquecidas à 60 °C por 30 minutos e em seguida resfriadas a temperatura ambiente e alquiladas com iodacetamida na concentração final de 30 mM e acondicionado em temperatura ambiente escuro por 25 minutos. Após, foi efetuado um *Quenching* nas amostras com objetivo de retirar o excesso de iodacetamida e adicionado 4,5 mM de DTT em cada tubo e incubado em temperatura ambiente por 20 minutos (CAMILLO-ANDRADE et al., 2020).

5.8.1.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS PAGE das proteínas obtidas das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães

Para verificar o perfil de amostras A eletroforese foi realizada em um sistema vertical Mini Protein III (Bio-Rad), sob uma corrente constante de 20 mA. O conteúdo proteico da extração do item 5.2.1 foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 13%, com 1 mm de espessura, na presença de SDS. Foram aplicados por poço 15 µL (cerca de 10 µg) de proteína extraída. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue (R-250 0,1% em metanol 40% e ácido acético 10%), por 30 min. Posteriormente, o gel foi descorado com uma solução descorante (metanol 40 %, ácido acético 10 % em água). O padrão de massa molecular utilizado foi *Precision Plus* (Bio-Rad#161-0375).

5.8.1.7 Digestão das proteínas obtidas das células THP-1 infectadas pelas cepas de L. infantum isoladas de cães

Para tanto, 100 µg de proteínas foram incubadas com tripsina modificada (Roche) na razão 1:100 (enzima/proteína, g/g) à 37 °C por 20 h. A digestão foi interrompida pela adição da solução de ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich) na concentração final de 0,4%. Os peptídeos foram então, quantificados utilizando o kit fluorométrico *Qubit* (Thermo Fisher Scientific) e a leitura realizado no *Qubit® 4.0* firmwares 3.11; (Thermo Fisher Scientific) conforme orientação do fabricante e descrito no item 5.8.1.5.

*5.8.1.8 Dessalinização dos peptídeos do proteoma das células THP-1 infectadas pelas cepas de *L. infantum* isoladas de cães*

Os peptídeos foram dessalinizados com a coluna Stage-Tips (STop and Go-Extraction TIPS) contendo C18 conforme Rappsilber, Ishihama e Mann (2003). Para tanto, foi adicionado 100 µL de metanol (Sigma-Aldrich®) para ativar a coluna, em seguida centrifugado a 1.000 x g por 2 minutos e descartou-se o líquido que passou, este passo foi repetido por duas vezes. Após a coluna foi equilibrada com 100 µL de uma solução de ácido fórmico 0,1% (Sigma-Aldrich), centrifugou-se a uma velocidade de 1.000 x g por 5 minutos e o líquido que passou, foi descartado, sendo este passo repetido por 1 vez. Um novo tubo de 2,0 mL foi colocado na centrífuga e a coluna de *Stage tip* já equilibrada foi transferida e identificada. Para cada *Stage tip*, foi transferido 10 µg de peptídeos, cada amostra foi transferida em duplicata. Em seguida, foi centrifugado a 1.000 x g for 5 minutos. Os tubos contendo os peptídeos não aderidos a coluna foram armazenados à -80 °C. Após, cada *Stage tip* foi lavado duas vezes com 100 µL da solução de ácido fórmico 0.1% (Sigma-Aldrich). Os *Stage tips*, em duplicata de cada amostra, foram armazenados à 4 °C até a análise por espectrometria de massas (CAMILLO-ANDRADE et al., 2020).

*5.8.1.9 Aquisição dos dados do proteoma das células THP-1 infectadas pelas cepas de *L. infantum* isoladas de cães*

Os peptídeos foram analisados por um espectrômetro de massa do modelo *Orbitrap Fusion Lumos* (Thermo Fisher Scientific®) disponibilizado pelo Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná (PDTIS-RPT02H). O sistema de nanocromatografia utilizado foi do *Easy NLC-1000* (Thermo Fisher Scientific). As injeções foram efetuadas em duplicata. Peptídeos foram carregados dentro de uma coluna de fase reversa (30 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno) compactado internamente com *ReprosilPur C18 Acqua* na fase estacionária (esferas de 1,9 µm de diâmetro, Dr. Maisch) a uma taxa de fluxo de 500 nL / min. Os peptídeos foram eluídos a uma taxa de fluxo de 250 nL / min aplicando um gradiente de 5–40% de tampão B (5% DMSO, 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila) por 180 min. O tampão A utilizado foi 5% DMSO em 0,1% de ácido fórmico.

Os espectros foram adquiridos no espectro de massa *LTQ Orbitrap XL-ETD medidor* (Thermo Fisher Scientific). O modo de análise utilizado foi a aquisição dependente de dados (DDA), alternando automaticamente entre a aquisição do MS de varredura completa e MS/MS com exclusão dinâmica de 90s. A varredura inicial MS (m/z 300–2000) foi realizada no sistema com uma resolução de 60.000 a 100 m/z . Os cinco íons mais intensos com carga 2+ e 3+ foram isolados, um de cada vez, e fragmentados por dissociação de colisão de alta energia (HCD) usando energia de colisão normalizada de 45 e 30 ms de tempo de ativação. Dinâmica exclusão foi hábil para uma duração de 90s e a coleta de espectro por aplicação de colisão de energia normalizada de 3 com tempo de MS/MS total de aquisição de 180 minutos. Todas as funções de varredura do espectrômetro de massa e os gradientes de solventes no nLC foram controlados pelo programa *Xcalibur 2.0* (Thermo Fisher Scientific).

5.8.1.10 Processamento dos dados do proteoma das células THP-1 infectadas pelas cepas de *L. infantum* isoladas de cães

As proteínas foram identificadas utilizando, como mecanismo de busca, o sistema Andromeda MS/MS para cada espectro e o algoritmo utilizado foi o MaxLFQ no programa *MaxQuant* versão 2.1.3.0. Os espectros de massa foram pesquisados em bancos de dados, usando *decoy* reverso, contendo as sequências das proteínas de *Homo sapiens* (*Human*) com 26.592 entradas revisadas do Swiss-Prot e de *L. infantum* cepa JPCM5 contendo 8.045 proteínas não revisadas no *TrEMBL* obtidas dentro do domínio do *UniProt* (<https://www.uniprot.org/proteomes/>) na data 09 de agosto de 2022.

Para a busca foi utilizada a opção *matching between runs*; a tolerância da massa do íon fragmento foi fixada em 0,5 Da e a tolerância do íon original em 20 ppm. A taxa máxima de descoberta de falsos peptídeos e proteínas (PSM FDR) foi fixada em 1%, o comprimento mínimo de sequência de sete resíduos de aminoácido. Os parâmetros de buscas foram os candidatos a peptídeo completos e semitriptico com massa de peptídeo máximo de 4.600 Da. A carbamidometilação da cisteína foi definida como modificação fixa, a oxidação da metionina como modificação variável e até duas clivagens perdidas foram permitidas. Para a análise quantitativa, as proteínas identificadas por um único peptídeo, mesmo sendo peptídeo único foram descartadas,

além disso, proteínas semelhantes, que representam uma sequência em outra sequência (fragmento), foram eliminadas.

5.8.1.11 Dados gerados do proteoma das células THP-1 infectadas pelas cepas de *L. infantum* isoladas de cães

Foram identificadas 4.681 proteínas de *Homo sapiens* e 764 proteínas de *L. infantum*. Estas proteínas foram submetidas a validação com base na detecção e identificação em ao menos duas das três replicatas biológicas, para a análise quantitativa, as proteínas identificadas por um único peptídeo, mesmo sendo peptídeo único foram descartadas, além disso, proteínas semelhantes, que representam uma sequência em outra sequência (fragmento), foram eliminadas e potenciais contaminantes e *hits* reversos foram removidos. Efetuou-se a normalização de dados utilizando as distribuições de contagem de intensidade de todas as amostras enviadas, estas não foram distribuídas normalmente e o conjunto de dados foi transformados em log e a largura ajustada para criar contagens de intensidade normalmente distribuídas, permitindo que uma análise estatística confiável a jusante fosse aplicada. Os valores dos sinais de espectros obtidos no MS, a determinação do total de proteína (TP) e a concentração de proteína (CP) obtidos pelos métodos de abordagem de proteína total (TPA) (WIŚNIEWSKI et al., 2014; 2017). Estes dados foram validados utilizando as manipulações e análises padrões do programa *Perseus* v.2.0.6.0 (TYANOVA et al., 2016). Os dados foram transferidos e organizados em planilha de *Microsoft Excel*.

$$TP = \frac{\text{Valores dos sinais espectros}}{\text{Somatório espectros Totais}}$$

$$CP \text{ (pg/mg)} = \frac{\text{Total de Proteína} \times 10^6}{\text{Massa molecular (kDa)}}$$

Fonte: Wiśniewski et al. (2014; 2017).

5.8.1.12 Análise dos dados do proteoma das cepas de *L. infantum* isoladas de cães

Para a análise dos dados do proteoma, utilizou-se os seguintes critérios: 1- análise das características qualitativas e quantitativas das 494 proteínas únicas do

proteoma; 2- análise das características qualitativas funcional e enriquecida das 225 proteínas únicas compartilhadas entre as seis cepas de isoladas dos cães; 3- análise de abundância diferencial, análise funcional e enriquecida das proteínas identificadas e compartilhadas entre as cepas isoladas de cada cão (Jack, Otto e Tchopo) e; 4- das características qualitativas e quantitativas, análise de enriquecimento funcional de proteínas únicas e exclusivas identificadas entre os isolados dos cães Jack, Otto e Tchopo, nas diferentes condições experimentais.

Utilizou-se a análise de componente principal (PCA) para determinar o perfil de distribuição das 494 proteínas identificadas nas seis cepas de *L. infantum* tratadas e não tratadas com miltefosina *in vitro*, como as variáveis utilizou-se a média do somatório das replicatas válidas do conteúdo total de proteína (TP), da concentração total de proteína (pmol/mg) (CP) e os valores dos sinais de espectros obtidos do MS dos peptídeos. As variáveis foram validadas utilizando a correlação de *Pearson* ($r < 0,9$). O programa utilizado foi o *PAST4* v.4.06 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

Os diagramas de *Venn* foram gerados para avaliar o ID (número de identificação - ID = da proteína no banco de dado *TriTrypDB* e *UniProt*) associados a diferentes categorias de análise de grupo desenvolvido no programa *InteractiVenn* (HEBERLE et al., 2015).

Uma análise secundária de PCA foi realizada para estabelecer o agrupamento das proteínas identificadas em cada cepa isolada dos cães (T0 e T1), nas condições experimentais de forma estatisticamente significativa por meio do programa *Perseus* v.2.0.6.0 (TYANOVA, et al., 2016) e o teste estatístico foi o *Student t* com Benjamini-Hochberg com FDR = 0,05 e $p < 0,05$.

Para as análises das proteínas diferencialmente abundantes foi considerado FDR=0,05, $s=0,1$ e número de randomização = 250, dentro do programa *Perseus*, ou seja, a diferença (TP_T1-TP_T0) com $\log(s) > 1$ ou < -1 e $p < 0,05$ foram consideradas significamente alteradas. Realizou-se esta análise de abundância diferencial utilizando as cepas isoladas do mesmo cão, quando tratadas e não tratadas com miltefosina (T0 *versus* T0 mil, T0 *versus* T1, T0 mil *versus* T1 mil, T1 *versus* T1 mil e T0 *versus* T1 mil). Não se efetuou comparações de diferença na abundância entre as proteínas de cepas de cães diferentes.

Outras análises foram performadas usando o programa *GraphPad Prism* 8.0.2. As análises de variância One e Two-way (ANOVA) foram utilizadas, em conjunto

com testes de múltipla comparação de Bonferroni, Sidak's e Tukey's para analisar diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$).

5.8.1.13 Análise funcional e análise funcional de enriquecimento do proteoma das cepas de *L. infantum* isoladas de cães

A análise funcional das proteínas identificadas no proteoma foi efetuada utilizando o programa *FastProtein* v.0.0.1 (<https://biolib.com/simoesrenato/FastProtein/>) que integra num só servidor as tradicionais anotações funcionais, pesquisa de similaridade e previsão de características de proteínas para um perfil proteômico global.

Como primeiro passo o programa *FastProtein* forneceu a predição das características bioquímicas, as quais englobaram o comprimento da proteína, massa molecular (kDa), hidrofobicidade, ponto isoelétrico (PI) e aromaticidade. No próximo passo foi efetuada a identificação dos domínios de N-glicosilação e retenção do retículo endoplasmático – obtidos pelo PROSITE (SIGRIST et al., 2013), PS00001 e PS00014, respectivamente. A análise de similaridade foi obtida por um passo adicional retornando com o melhor hit usando o *BLASTp* (CAMACHO et al., 2009) através da biblioteca BioJava. Próximo passo, foi efetuada a predição da localização subcelular utilizando o *WoLF PSORT* (HORTON et al., 2007), para organismos eucariotos. A predição de domínios de transmembrana, peptídeos sinal e âncoras de GPI foram performadas pelo *THMM-2* (KROGH et al., 2001), *SignalP 5.0* (ARMENTEROS et al., 2019) e *PredGPI* (PIERLEONI; MARTELLI; CASADIO, 2008), respectivamente.

A anotação funcional foi performada pelo *InterProScan API* (JONES et al., 2014) fornecida pelo site EMBL (MADEIRA et al., 2022). Os serviços do *InterProScan* na web têm limite de 1.000 proteínas por execução, dessa forma as proteínas foram divididas em subarquivos. Os subarquivos de saída são mesclados e analisados pelo *InterProScan* para obter o PFAM (MISTRY et al., 2021), PANTHER (THOMAS et al., 2022), *InterPro Annotations* (IPR) (JONES et al., 2014), *Annota* (MAIA et al., 2022) e *Gene Ontology* (GO) (ASHBURNER et al., 2000). Os termos de ontologia foram analisados e geraram relatórios quantitativos classificando em funções moleculares, componentes celulares e processos biológicos. Quando mais de uma atribuição estava disponível, todas as anotações funcionais foram consideradas nos resultados.

O *FastProtein* separadamente fornece cinco evidências para identificação de proteínas de membrana celular: âncoras de GPI, domínios transmembrana (TM), localização subcelular (SL), ontologia gênica (GO), identificação interpro (IPR) e produz um histograma de massa molecular.

Além do programa *FastProtein*, utilizou-se a ferramenta *on line* do *TriTrypDB* (<http://tritypdb.org>, v 59), para a identificação de GO baseado na lista de ID (número de identificação da proteína), acessada no dia 14 de novembro de 2022.

Realizou-se a análise funcional dos termos de GO utilizando o mecanismo de busca o *FastProtein* e *TriTrypDB* (citados acima) com evidência apenas de dados curados. Foi considerado o organismo *L. infantum* cepa JPCM5 na data 03 de novembro de 2022. Para visualizar e comparar os resultados de anotação GO foi utilizado com base na distribuição das funções dos genes em *L. infantum* a ferramenta *Web Gene Ontology Annotation Plot - WEGO* (YE, 2018).

A análise de enriquecimento de termos de GO, que busca encontrar GOs sobre ou sub representados presentes na amostra em análise frente ao de referência (referência do consorcio), foi realizada por meio do servidor *online TriTrypDB* com evidência em dados curados e $p < 0,05$ (referência do *online TriTrypDB*), considerando o organismo *L. infantum* cepa JPCM5 como referência, na data 03 de novembro de 2022. Os termos de GO redundantes foram resumidos com *GO-Figure!* que cria similaridades semânticas e elimina redundâncias das combinações de GO com funções relacionadas, foram aceitos até 10 termos. A representação gráfica mostra que o *Semantic space Y e X* significa espaço limite de similaridade semântica dos termos de GO, as cores dos círculos são baseadas no valor de $p < 0,05$, representado em $\log(p\text{valor})$. O tamanho dos círculos representa o número de termos de GO na categoria em questão. Os algarismos arábicos representam a distribuição dos 10 principais termos de GO (REIJNDERS; WATERHOUSE, 2020).

As proteínas identificadas de *L. infantum* nas cepas isoladas de cães, também foram classificadas em grupos funcionais de acordo com dados da literatura (PAAPE; AEBISCHER, 2011; BIYANI; MADHUBALA, 2012; LYNN; MARR; MCMASTER, 2013; MOREIRA et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2014; PIRES et al., 2014; JARDIM et al., 2018; TASBIHI et al., 2019; SANCHIZ et al., 2020; FIALHO-JUNIOR et al., 2021; COTARZZO et al., 2022; PACAKOVA et al., 2022; TANO et al., 2022).

5.8.1.14 Disponibilidade dos dados do proteoma das cepas de *L. infantum* isoladas de cães

Os espectros de MS e os dados proteômicos foram parcialmente depositados no *ProteomeXchange Consortium* (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via o *PRIDE partner repository* (PXD040790).

5.8.2 Predição de epítomos de células B no proteoma de cepas de *L. infantum* isoladas de cães

Para a identificação de epítomos de células B foi utilizado o programa *EpiBuilder* (<https://biolib.com/simoesrenato/EpiBuilder-1/>) (MOREIRA et al., 2022), com parâmetro de threshold de 0,1512, identidade e de cobertura de 70, tamanho mínimo do epítomos de 10 e máximo de 30 aminoácidos e sem domínio de N-glicosilação. Como entrada foi utilizado os arquivos gerados pelo *BepiPred-3.0*. O *EpiBuilder* gerou resultados de saída dos dados e ofereceu suporte a uma abordagem de processamento em todo o proteoma. Além disso, este programa forneceu os seguintes recursos: previsão de dobra beta (CHOU; FASMAN, 1978); previsão de acessibilidade de superfície (EMINI et al., 1985), previsão de flexibilidade em cadeia de proteína (KARPLUS; SCHULZ, 1985), antigenicidade (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990), previsão de hidrofobicidade (PARKER; GUO; HODGES, 1986). Além disso, a massa molecular (MW), ponto isoelétrico (pI) e índice de hidropatia de cada aminoácido são calculados usando a biblioteca BioJava (LATIFA et al., 2019). A previsão de domínios de N-glicosilação foi determinada usando um programa desenvolvido *in house*. Essas informações geraram uma topologia única para cada epítomo, demonstrando visualmente suas características.

Para busca de epítomos em outros proteomas, o *EpiBuilder* utilizou o programa *BLASTp*, com parâmetros de identidade = 90, para a comparação de similaridades das sequências proteicas do proteoma oriundo deste estudo com as anotadas dos organismos *L. amazonensis* cepa MHOM/BR/71973/M2269, *L. braziliensis* cepa MHOM/BR/75/M2903, *L. donovani* cepa LdCL (UP000274082), *L. infantum* cepa JPCM5 e *L. major* cepa Friedlin, as quais foram obtidas do banco de dados *TrypDB* versão 57 e *UniProt* versão 03/2022 na data de 05 de outubro de 2022.

Para a predição dos possíveis epítomos para cada uma das 495 proteínas analisadas, as sequências proteicas foram alinhadas por meio do programa *Clustal Ômega* e analisadas (comparadas) com as sequencias similares obtidas por meio do *BLASTp* das espécies de *Leishmania* selecionadas nos bancos.

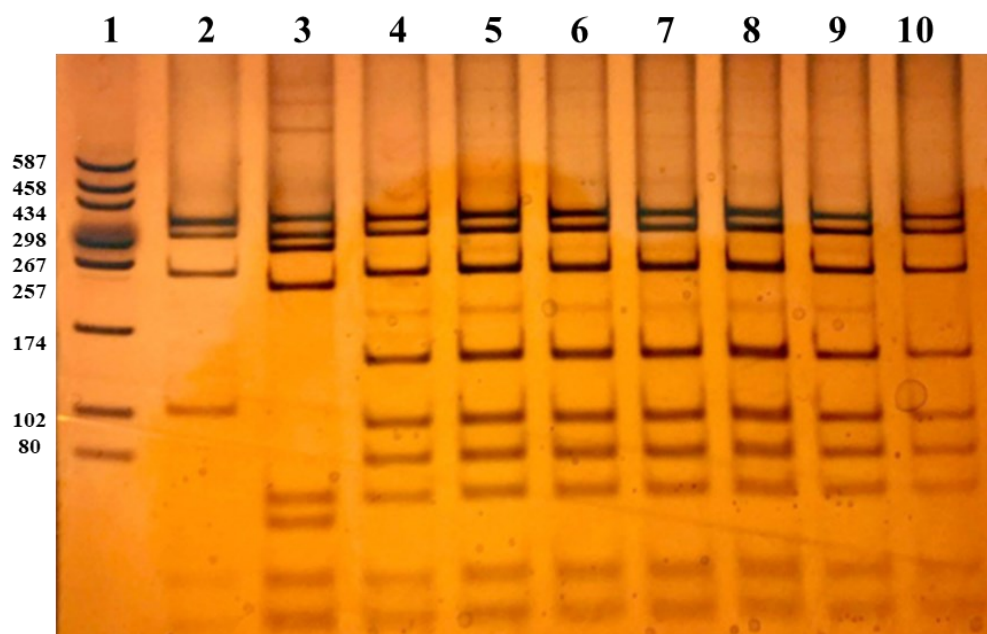
6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE DA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DAS CEPAS ISOLADAS DE CÃES

6.1.1 Caracterização molecular das cepas de *Leishmania* spp. isoladas de cães por PCR-RFLP

Por meio da técnica de PCR-RFLP foi possível caracterizar as cepas JACK_T0, JACK_T1, OTTO_T0, OTTO_T1, TCHOPO_T0 e TCHOPO_T1 como pertencentes a espécie *L. infantum* (Figura 8).

Figura 8 – Identificação molecular da espécie de *Leishmania* spp das cepas isoladas dos cães por PCR-RFLP



*Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado com Nitrato de prata. Gel representativo do produto de 1300pb da PCR HSP70 digerido com a enzima *HaeIII* obtidos a partir dos isolados dos cães Jack, Otto e Tchopo, T0 e T1: Padrão de peso molecular (DNA do plasmídeo PUC18 digerido com a enzima *HaeIII*), 2: *Leishmania amazonensis* cepa MHOM/BR/77/LTB0016, 3: *Leishmania braziliensis* cepa MHOM/BR/75/M-2904; 4: de *Leishmania infantum* cepa MHOM/BR/1975PP75; 5:

cepa JACK_T0; 6: cepa JACK_T1; 7: cepa OTTO_T0; 8: cepa OTTO_T1; 9: cepa TCHOPO_T0; 10: cepa TCHOPO_T1.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

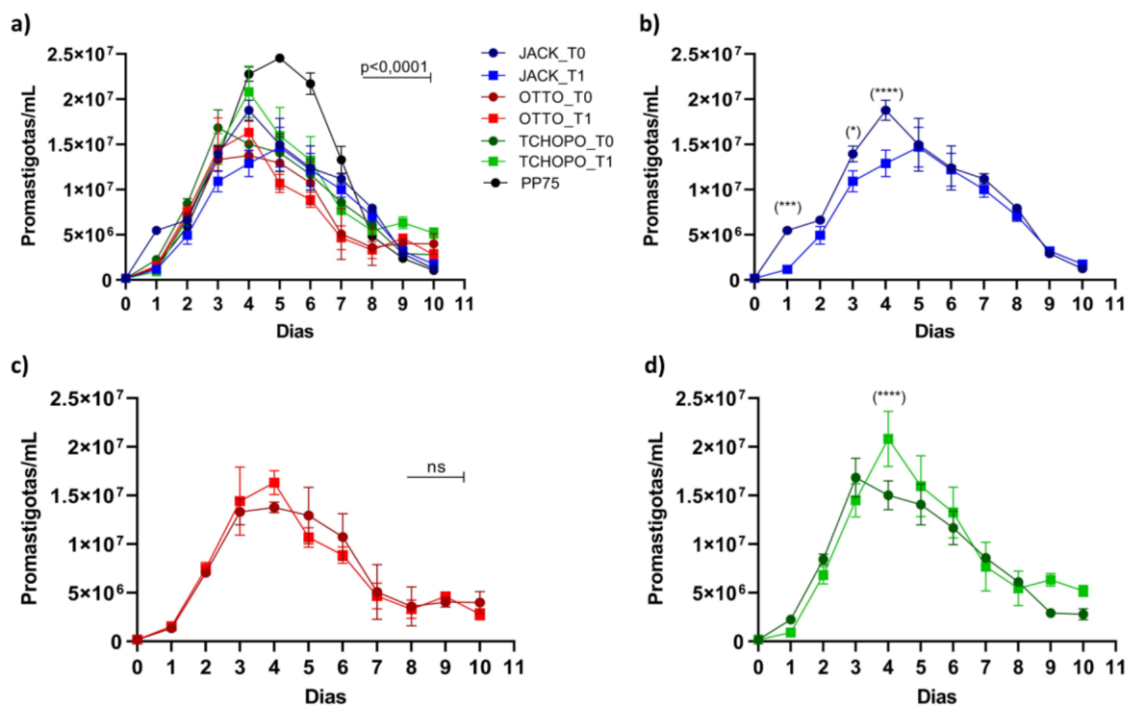
6.1.2 Curva de crescimento das formas promastigotas das cepas de *L. infantum*

A Figura 9 mostra a cinética da curva de crescimento das formas promastigota das cepas JACK_T0, JACK_T1, OTTO_T0, OTTO_T1, TCHOPO_T0, TCHOPO_T1 e PP75.

Quando comparado a curva de crescimento das cepas isoladas dos cães Jack, Otto e Tchopo com a cepa PP75, estas mostraram diferenças na cinética de crescimento ($F_{6,170} = 20,06$, $p < 0,0001$) nos dias analisados ($F_{10,170} = 379,7$; $p < 0,0001$) (Figura 9a).

Quando comparado o perfil de crescimento entre as cepas isoladas dos cães nos tempos T0 e T1 a análise mostrou diferenças pontuais na cinética de crescimento das cepas isoladas dos cães Jack e Tchopo (Figura 9b e 9d) e estabilidade entre as cepas do cão Otto (Figura 9c).

Figura 9 – Curva de crescimento das formas promastigotas das cepas de *L. infantum*



*Foram cultivados 2×10^5 promastigotas/mL em meio Schneider completo, as contagens foram realizadas a cada 24 horas durante 10 dias. Os valores foram calculados utilizando a média das triplicatas. Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e todos os outliers detectados pelo teste de ROUT foram retirados. Efetuou-se análises pelo teste Two way ANOVA e teste de comparação múltipla de Sidak's. Valores com diferença estatística ($p < 0,05$) são

mostrados pelos asteriscos. (a) A curva de crescimento das cepas JACK_T0, JACK_T1, OTTO_T0, OTTO_T1, TCHOPO_T0, TCHOPO_T1 e PP75 apresentou diferença ($p < 0,0001$) na cinética de crescimento e nos diferentes tempos. (b) A curva de crescimento das cepas JACK_T0 e JACK_T1 apresentou diferença ($p < 0,0001$) na cinética de crescimento e nos diferentes dias. O teste múltiplo de *Tukey's* mostrou diferença na cinética de crescimento nos dias 2 ***($p = 0,0003$), 4 *($p = 0,0254$) e 5****($p < 0,0001$). (c) A curva de crescimento das cepas OTTO_T0 e OTTO_T1, não apresentou diferença na cinética de crescimento e nos diferentes dias. ns: não apresentaram diferença significativa. (d) A curva de crescimento das cepas TCHOPO_T0 e TCHOPO_T1 apresentou diferença ($p < 0,0001$) na cinética de crescimento e nos diferentes dias. O teste múltiplo de *Tukey's* mostrou diferença na cinética de crescimento no 5 dia ****($p < 0,0001$).

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A Tabela 4, mostra que ao final da fase logarítmica e início da fase estacionária de crescimento das cepas *L. infantum* isoladas de cães e da cepa PP75, foi observada diferença significativa no tempo de duplicação entre as cepas do mesmo cão (T0 e T1) e entre todas as cepas quando comparadas com a cepa PP75, não havendo diferença entre as taxas de crescimento das cepas do mesmo cão (T0 e T1) e entre todas as cepas isoladas de cães quando comparada com a cepa PP75.

Tabela 3 – Valores de tempo de duplicação e taxa de crescimento em promastigotas das cepas *L. infantum*

Isolados/Cepa	TF (horas)	TD (horas)	TC (horas)
JACK_T0	96	14,66± 0,20 ^(a d, f)	0,0473±0,0006 ^(h)
JACK_T1	120	19,41±0,66 ^(b)	0,0358±0,0012 ^(h)
OTTO_T0	96	15,72±0,15 ^(c)	0,0441±0,0004 ^(h)
OTTO_T1	96	15,13±0,25 ^(d)	0,0458±0,0008 ^(h)
TCHOPO_T0	72	11,28±0,32 ^(e)	0,0615±0,0017 ^(h)
TCHOPO_T1	96	14,36±0,42 ^(f)	0,0483±0,0014 ^(h)
PP75	120	17,29±0,06 ^(g)	0,0401±0,0001 ^(h)

TF: Tempo final da fase logarítmica de crescimento (horas); TD: Tempo de duplicação (tempo em horas necessárias para a duplicação da população celular), TC: Taxa de crescimento (números de divisões por unidade de tempo - horas). Para os cálculos utilizou-se o Programa Doubling Time v 3.1.0 (ROTH, 2006) e os valores utilizados foram as concentrações iniciais de parasito e finais obtidos para cada isolado no final da fase logarítmica e início da fase estacionária, bem como o tempo de crescimento desta fase. Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e não apresentaram *outliers* detectados pelo teste de ROUT. Efetuou-se análises estatísticas utilizando o teste Two-way ANOVA e teste de múltipla comparação de *Tukey's*. Letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$), letras diferentes apresentam diferenças significativas $p < 0,05$

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.1.3 Caracterização *in vitro* da infectividade das cepas de *L. infantum* em células THP-1

A capacidade infectiva das seis cepas isoladas de cães e da cepa PP75 foi distinta nos tempos 24, 48, 72 e 96 h de infecção analisados ($F_{18,92}=14,91$; $p < 0,0001$).

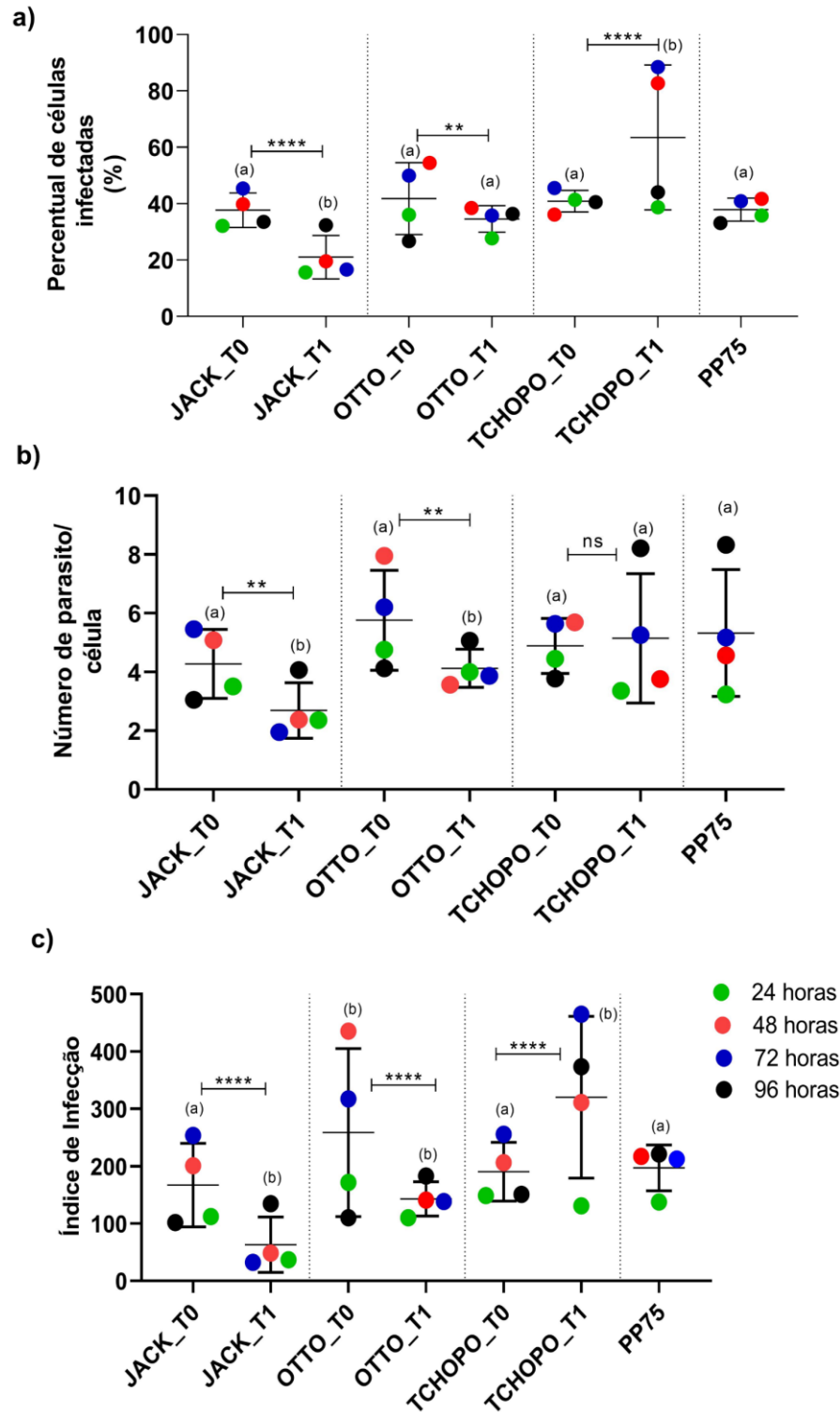
Efetuuou-se a comparação da capacidade de infecção entre as cepas isoladas do mesmo cão (T0 e T1). A média do percentual de infecção nos quatro tempos da cepa JACK_T0 *versus* a cepa JACK_T1 foi maior, bem como a média do percentual de infecção da cepa OTTO_T0 *versus* a cepa OTTO_T1. Diferentemente, nas cepas isoladas do cão Tchopo, a média do percentual de infecção, nos quatro tempos analisados, foi maior na cepa TCHOPO_T1. Quando todas as cepas isoladas de cães foram comparadas a cepa PP75, o percentual médio de infecção nos quatro tempos, foi menor para a cepa JACK_T1 e maior para a cepa TCHOPO_T1 (Figura 10a).

Em relação ao número de parasitos por célula THP-1 foi observado uma diferença no número médio de amastigotas intracelulares entre as seis cepas e a cepa PP75 nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas de infecção analisados ($F_{18,96}=5,767$; $p < 0,0001$).

A cepa JACK_T0 apresentou maior número médio de amastigotas por célula que a cepa JACK_T1 nos quatros tempos. O mesmo foi observado para a cepa OTTO_T0 em relação a cepa OTTO_T1. Já, entre as cepas TCHOPO_T0 e TCHOPO_T1 a média do número de parasito por célula THP1, nos quatro tempos, não apresentou diferença. Quando as seis cepas foram comparadas a cepa PP75 o número médio de parasito por célula THP1, nos quatro tempos, foi menor nas cepas JACK_T1 e OTTO_T1 (Figura 10b).

O índice de Infecção celular (IF) é uma ferramenta que associa o percentual de células infectadas com o número de parasito por célula, o que propicia uma visão mais realista da infectividade das cepas, podendo este ser comparado com outras variáveis. Na Figura 10c é possível observar as médias do IF de cada cepa nos tempos 24, 48, 72 e 96 h. O maior IF foi da cepa TCHOPO_T1, seguido da OTTO_T0, JACK_T0, TCHOPO_T0, cepa PP75 e das cepas OTTO_T1 e JACK_T1 (sem diferença).

Figura 10 – Percentual de infecção, número médio de amastigotas e índice de Infecção celular em células THP-1 das cepas de *L. infantum* nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h



Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e todos os outliers detectados pelo teste de ROUT foram retirados. Efetuou-se as análises pelo teste Two-way ANOVA e o teste de múltipla comparação de Tukey's foram considerados valores de $p < 0,05$. (a) Percentual de infecção, as comparações foram entre as médias dos percentuais de célula infectada das cepas isolados de cães nos tempos T0 versus T1, onde $**p = 0,005$ e $****p < 0,0001$. Quando comparadas as

médias dos percentuais de células infectadas de todas as cepas isoladas de cães com a cepa PP75, letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$), letras diferentes apresentam diferenças significativas $p<0,05$; (b) Número de parasito/célula THP-1 infectada, efetuou-se as comparações entre as médias dos valores do número de parasito por célula infectada das cepas isoladas de cães no tempo T0 *versus* T1, onde $**p<0,001$ e a comparação entre as médias dos valores do número de parasito por célula infectada das cepas isoladas de cães com a cepa PP75, letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$), letras diferentes apresentam diferenças significativas $p<0,05$; (c) Índice de infecção, efetuou-se as comparações entre as médias dos valores do índice de infecção celular das cepas isoladas de cães tempo T0 *versus* T1, onde $****p<0,0001$ e a comparação entre as médias dos valores do índice de infecção celular das cepas isoladas de cães com a cepa PP75, letras iguais não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$), letras diferentes apresentaram diferenças significativas $p<0,05$.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A Tabela 5, mostra o tempo de duplicação (TD) e taxa de crescimento (TC) das formas amastigotas intracelulares das cepas isoladas de cães e da cepa PP75. Nas cepas JACK_T0, OTTO_T0, OTTO_T1 TCHOPO_T0, TCHOPO_T1 e PP75 o tempo de duplicação foi maior que 48 horas e na cepa JACK_T1 não se identificou duplicação.

Tabela 5 – Valores de tempo de duplicação e taxa de crescimento de amastigotas das cepas *L. infantum*

Isolados/Cepa	TI e TF (horas)	TD (horas)	TC (horas)
JACK_T0	24-72	65,10±18,59	0,011±0,004
JACK_T1	24-72	ND	-
OTTO_T0	24-72	>96	0,005±0,004
OTTO_T1	24-72	>96	0,002±0,003
TCHOPO_T0	24-72	93,18±49,99	0,023±0,021
TCHOPO_T1	24-72	60.85±8.91	0,009±0,006
PP75	24-72	>96	0,004±0,001

TI: tempo inicial (horas) e TF: Tempo final de duplicação (horas); TD: Tempo de duplicação (tempo em horas necessárias para a duplicação da população celular), TC: Taxa de crescimento (números de divisões por unidade de tempo - horas), ND: não ocorreu duplicação, (-): não calculado. Para os cálculos foi utilizado o Programa *Doubling Time* v 3.1.0 (ROTH, 2006) e os valores utilizados foram as concentrações iniciais de parasito e finais obtidos para cada isolado no final da fase logarítmica e início da fase estacionária, bem como o tempo de crescimento desta fase.

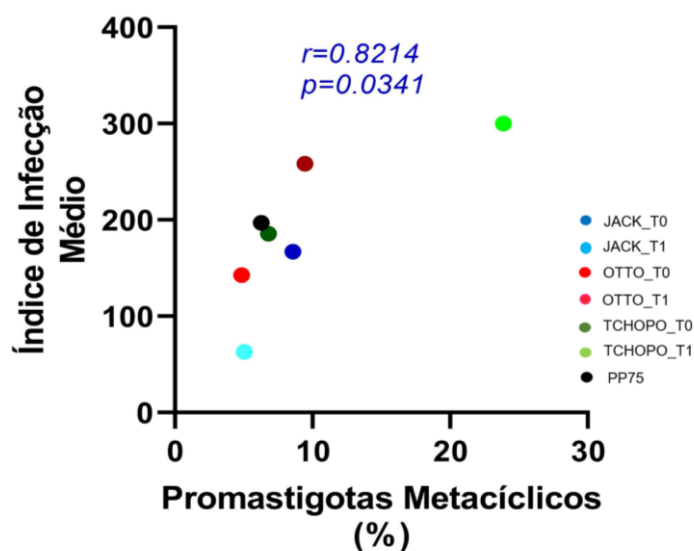
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

6.1.4 Correlação entre IF e promastigotas metacíclicos das cepas de *L. infantum*

A média do índice de infecção dos quatro tempos analisados de cada cepa de *L. infantum* foi correlacionada com o percentual de formas promastigotas metacíclicas

do 3º dia de cultivo, observou-se alta correlação entre o percentual de formas promastigotas metacíclicas e a média do IF das cepas (Figura 11). Estes resultados sugerem que a maior infectividade está correlacionada com o maior número de formas promastigotas metacíclicas presentes em cultura.

Figura 11 – Análise da correlação entre a média dos índices de infecção (IF) nos quatro tempos e o percentual de formas promastigotas metacíclicas presentes no momento da infecção



Os dados não se apresentaram normais pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e não foram detectados outliers pelo teste de ROUT. Efetuou-se análises pelo teste correlação de *Spearman*. Sendo considerado correlação alta $r > 0,8$ com $p < 0,05$, valores grifados em azul ($r = 0,8214$; $p = 0,0341$).
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.1.4.1 Determinação do percentual médio de promastigotas metacíclicas das cepas de *L. infantum*

Para a caracterização biológica das cepas isoladas de cães e a cepa PP75 foram utilizadas promastigotas metacíclicas de 3º dia de cultivo. Com intuito de aumentar o número de promastigotas metacíclicas para a realização do experimento 5.8.1, avaliou-se a relação entre o percentual de formas promastigotas metacíclicas no 3º e 4º dia de cultivo das cepas.

Na Tabela 6 está representada o percentual de formas promastigotas metacíclicas das cepas. As cepas JACK_T1, OTTO_T1 e TCHOPO_T0 aumentaram o percentual de formas promastigotas metacíclica no 4º dia de cultivo. A cepa

TCHOPO_T1 se destacou com maior percentual de formas metacíclicas presentes na cultura tanto no 3º quanto no 4º dia.

Tabela 6 – Percentual de formas promastigotas metacíclicas das cepas de *L. infantum*

Isolados e cepa de <i>L. infantum</i>	Formas promastigotas metacíclicas de 3º dia de cultivo (%)	Formas promastigotas metacíclicas de 4º dia de cultivo (%)
JACK_T0	8,56 ± 2,04 ^(a)	12,93 ± 1,05 ^(a)
JACK_T1	5,04 ± 2,06 ^(a)	15,75 ± 0,34 ^(b)
OTTO_T0	9,45 ± 2,19 ^(a)	12,96 ± 4,07 ^(a)
OTTO_T1	4,84 ± 1,65 ^(a)	13,59 ± 4,55 ^(b)
TCHOPO_T0	6,78 ± 1,73 ^(a)	15,71 ± 0,03 ^(b)
TCHOPO_T1	23,85 ± 2,62 ^(a)	24,53 ± 6,41 ^(a)
PP75	6,25±0,35 ^(a)	8,25±0,35 ^(a)

Todos os dados apresentaram-se normais pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e não foi detectado outliers pelo teste de ROUT. Efetuou-se análises pelo teste Two-way ANOVA e teste de múltipla comparação de Sidak's pareado entre as cepas de 3º e 4º dia, letras iguais não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$), letras diferentes apresentaram diferenças significativas $p<0,05$.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.1.5 Caracterização *in vitro* da suscetibilidade a miltefosina das cepas de *L. infantum* nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares

Os valores das CI_{50} , CC_{50} e IS da miltefosina frente as formas amastigotas intracelulares e promastigotas, e o IF das cepas de *L. infantum* estão representados na Tabela 7.

Os valores de CI_{50} da miltefosina obtidos para as cepas JACK_T0 e T1, OTTO_T0 e T1 e TCHOPO_T0 e T1 não apresentaram diferença quando comparados entre as cepas do mesmo cão (T0 e T1), tanto nas formas amastigotas intracelulares quanto nas formas promastigotas, demonstrando que o perfil de suscetibilidade a miltefosina, pelo menos em nível de comportamento *in vitro*, entre as cepas isoladas do mesmo cão, não foram alteradas após o tratamento *in vivo* dos cães e nem nas diferentes formas (amstigotas e promastigotas) (Tabela 7).

Os valores de CI_{50} da miltefosina para as formas amastigotas intracelulares das cepas JACK_T0 e T1, OTTO_T0 e T1 e TCHOPO_T0 e T1 foram comparados com o valor obtido de CI_{50} para a cepa PP75, não houve diferença. No entanto, os valores obtidos de CI_{50} para as formas promastigotas das cepas isoladas de cães em

comparação ao valor obtido de CI_{50} para as formas promastigotas da cepa PP75, todos apresentaram diferença significativa. Em relação aos valores obtidos de CI_{50} para a anfotericina B frente as formas promastigotas de todas as cepas avaliadas não apresentaram diferença (Tabela 7).

O valor de CC_{50} da miltefosina frente as células THP1 apresentou valor de $18,26 \pm 4,92$, o IS da miltefosina frente as diferentes cepas variaram de 6 a 23 e o índice de especificidade (SPI) foi maior que 2 para todas as cepas, indicando que a miltefosina é mais ativa na forma amastigota intracelular (Tabela 7). Não foi observado alta correlação entre o IF após 96 h e os valores de CI_{50} de amastigota intracelular das cepas pela análise de *Pearson* ($r=0,3987$, $p=0,4337$), sugerindo que a atividade da miltefosina não está relacionada a maior ou menor IF celular.

Tabela 7 – Valores médios da CI_{50} , CC_{50} , IS, SPI da miltefosina frente as formas promastigotas e amastigotas e o IF das cepas de *L. infantum*

Compostos	$CI_{50} \mu M \pm DP$		Anfotericina B	$CC_{50} \mu M \pm DP$		IS	SPI (a)		IF (b)
	miltefosina			miltefosina			miltefosina		
Cepas	Proma	Ama	Proma	THP-1	CC_{50} (THP-1) / CI_{50} Amastigotas	CI_{50} Promastigotas / CI_{50} Amastigotas			
JACK_T0	5,14 ± 1,45 ^(a, b)	0,81 ± 0,43 ^(e)	0,22 ± 0,17 ^(f)		22,82	6,37	51,58 ± 4,86 ^(g)		
JACK_T1	4,04 ± 0,78 ^(b)	1,44 ± 0,24 ^(e)	0,23 ± 0,02 ^(f)		12,68	2,82	45,52 ± 22,99 ^(g)		
OTTO_T0	7,21 ± 0,28 ^(a, c)	1,52 ± 0,08 ^(e)	0,25 ± 0,10 ^(f)		12,01	4,76	29,73 ± 8,55 ^(g)		
OTTO_T1	6,85 ± 1,07 ^(a, c)	2,81 ± 0,94 ^(e)	0,34 ± 0,18 ^(f)	18,26 ±	6,50	2,44	67,17 ± 20,20 ^(g)		
TCHOPO_T0	7,87 ± 0,45 ^(c)	1,35 ± 0,14 ^(e)	0,37 ± 0,22 ^(f)	4,92	13,52	5,82	60,66 ± 7,47 ^(g)		
TCHOPO_T1	6,86 ± 1,72 ^(a, c)	2,10 ± 0,49 ^(e)	0,17 ± 0,06 ^(f)		8,70	3,27	173,64 ± 33,94 ^(h)		
PP75	11,40 ± 2,45 ^(d)	1,34 ± 0,33 ^(e)	0,24 ± 0,021 ^(f)		13,63	8,51	88,89 ± 19,21 ^(g)		

*DP: desvio padrão; IS: índice de seletividade, SPI: índice de especificidade, IF: índice de infecção, Proma: formas promastigotas; Ama: formas amastigotas. Todos os valores calculados de CI_{50} e CC_{50} foram obtidos das placas que apresentaram Fator Z > 0,5, As CI_{50} considerados foram todos que apresentaram $r^2 > 0,9000$ (a) SPI: foi calculado pela razão do CI_{50} da forma promastigota e CI_{50} da forma amastigota, (b) IF: foi calculado pela média do índice de infecção obtido para cada isolado após 96 horas de infecção na ausência da miltefosina. Os dados da tabela foram submetidos a análise estatística apresentaram-se normais pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e não foi detectado outliers pelo teste de ROUT. As análises foram efetuadas pelo teste Two-way ANOVA e o teste de múltipla comparação de Tukey's foram considerados valores de $p < 0,05$. Letras iguais não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), letras diferentes apresentaram diferenças significativas $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.2 ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES DE SUSCETIBILIDADE À MILTEFOSINA NAS CEPAS ISOLADAS DE CÃES E CEPA PP75

6.2.1 Análise da transcrição dos genes de suscetibilidade à miltefosina nas formas promastigotas nas cepas de *L. infantum*

A representação da curva de dissociação dos genes LiABCG4, LiABCG6, AQP1, LiMT, LiRos3 e GAPDH está demonstrada no Anexo A.

A análise de PCA dos genes de suscetibilidade à miltefosina com variância PC1 e PC2 de 60,62% mostrou a formação de dois agrupamentos das cepas isoladas de cães com e sem tratamento e um grupamento com a cepa PP75 com e sem tratamento com miltefosina. Nos agrupamentos contendo as cepas isoladas dos cães, a exceção da cepa OTTO_T1 tratada com miltefosina, as similaridades em relação as variáveis agruparam separadamente as cepas com e sem tratamento (Figura 12). Isto sugere que as formas promastigotas das cepas isoladas de cães, quando submetidas ao tratamento com miltefosina, apresentaram uma modulação na transcrição dos genes envolvidos com a suscetibilidade à miltefosina.

Figura 12 – Gráfico representativo da análise de PCA dos genes LiABCG4, LiABCG6, AQP1, LiMT e LiRos3 das cepas de *L. infantum* tratadas e não tratadas *in vitro* com miltefosina

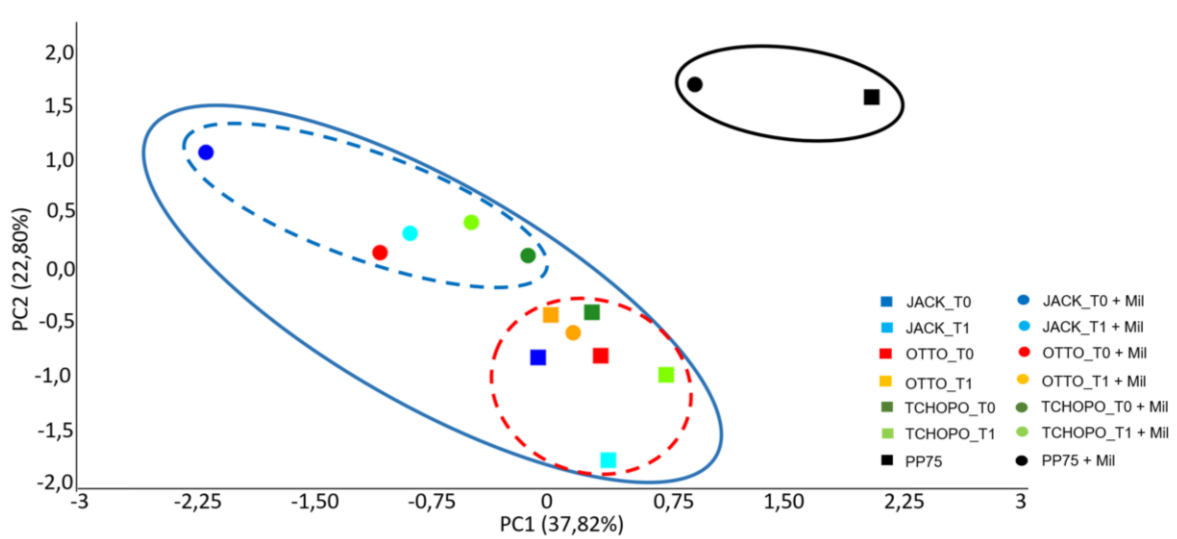


Gráfico de dispersão de PCA do conjunto dos dados: número de transcritos por ng de RNA dos genes LiABCG4, LiABCG6, AQP1, LiMT, LiRos3 normalizados pelo número de transcritos por ng de RNA do gene GAPDH dos seis isolados tratados e não tratados com miltefosina utilizando o

programa PAST4 v.4.06 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Cepa + Mil: cepa tratada com miltefosina.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para avaliar a alteração na transcrição de genes foi considerado o ponto de corte $FC > 3$ e valor de $p < 0,05$. A análise diferencial foi relacionada com a cepa de cada cão no tempo T0 e para a cepa PP75 utilizou-se esta sem tratamento com miltefosina, uma vez que a cepa de referência PP75, agrupou separadamente das cepas isoladas de cão, sugerindo um comportamento em nível de transcrição distinto das cepas isoladas de cão (Figura 12).

Para os genes LiABCG6, AQP1 e LiRos3 não houve diferença na modulação entre as cepas no tempo T0 e as cepas no tempo T0 tratada com miltefosina e tempo T1 tratada e não tratada com miltefosina. No entanto, para o gene LiABCG4 as cepas JACK_T1 e OTTO_T0 tratadas com miltefosina, apresentaram aumento significativo na transcrição gênica. Para o gene LiMT a cepa JACK_T1 tratada com miltefosina apresentou aumento significativo na transcrição (Tabela 8).

Tabela 8 – Representa a modulação da transcrição dos genes de suscetibilidade à miltefosina das cepas de *L. infantum*

Genes	Cepas isoladas do cão Jack			Cepas isoladas do cão Otto			Cepas isoladas do cão Tchopo			Cepa MHOM/BR/1974/ PP75
	T0 Mil	T1	T1 Mil	T0 Mil	T1	T1 Mil	T0 Mil	T1	T1 Mil	PP75 Mil
	<i>versus</i> s T0	<i>versus</i> T0	<i>versus</i> T0	<i>versus</i> T0	<i>versus</i> T0	<i>versus</i> T0	<i>versus</i> T0	<i>versus</i> T0	<i>versus</i> T0	<i>versus</i> PP75
ABCG4	-	-	5,4 ↑	3,0 ↑	-	-	-	-	-	-
ABCG6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AQP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LiMT	-	-	2,5 ↑	-	-	-	-	-	-	-
LiROS3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ponto de corte validado para a qPCR = *Fold-change* (FC) > 3, ou seja, $\text{Log}_2(\text{FC}) < -1,58$ e $> 1,58$ e $p < 0,05$ ou seja $\text{Log}_{10}(p) > 1,30$. (-) = ausência de variação na modulação utilizando o ponto de corte; (↑) = modulação positiva utilizando o ponto de corte. Os valores de transcritos das cepas dos genes de suscetibilidade LiABCG4, LiABCG6, AQP1, LiMT, LiRos3 foram normalizados com os valores de transcritos das cepas do gene de referência GAPDH, o cálculo está descrito na metodologia (5.7.1.5). T0= cepa isolada do cão antes do tratamento *in vivo* com miltefosina; T1= cepa isolada do cão após o tratamento *in vivo* com miltefosina; T0 Mil: cepa no tempo 0 tratada com miltefosina *in vitro*; T1 Mil: cepa no tempo 1 tratada com miltefosina *in vitro*, PP75= cepa de referência sem tratamento com miltefosina e PP75 Mil: cepa de referência tratada com miltefosina. Os valores representados na tabela estão em log_2 .

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.2.2 Análise das sequências dos genes suscetibilidade a miltefosina das formas promastigotas de *L. infantum* das cepas isoladas de cães

6.2.2.1 Alinhamento das sequências nucleotídicas e aminoacídicas referentes aos genes relacionados a suscetibilidade a miltefosina em Leishmania spp.

O resultado do alinhamento das sequências nucleotídicas e aminoacídicas referentes aos genes LiABCG4, LiABCG6, AQP1, LiMT, LiRos3 relacionados a suscetibilidade a miltefosina de *L. infantum* isoladas de cães e humano de Santa Catarina frente as sequências depositadas no banco de dados de *Leishmania* spp. mostraram que todas as cepas isoladas de cães e humano de SC possuem 100% de identidade com a cepa de referência JPCM5 de *L. infantum*, para todos os cinco genes analisados (ANEXO B e C).

6.3 ANÁLISE PROTEOMICA DAS FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES DAS CEPAS ISOLADAS DE CÃES

6.3.1 Determinação da viabilidade celular, percentual de infecção e carga parasitária do experimento 5.8.1

A Tabela 9 mostra a concentração celular média, o percentual de células viáveis, o percentual de células THP1 infectadas e suas respectivas cargas parasitárias pelas cepas JACK_T0, JACK_T1, OTTO_T0, OTTO_T1, TCHOPO_T0 e TCHOPO_T1 do experimento 5.8.1. Constatou-se uma perda celular média de 90% quando as células foram infectadas e expostas ou não ao tratamento com miltefosina. Para as células não infectadas, tratadas e não tratadas com miltefosina a perda média foi 58,44%. Não foi observado diferença significativa no percentual de infecção entre as cepas com e sem tratamento com miltefosina, apesar da variação. A estimativa da carga parasitária nas células THP1 infectadas utilizando a qPCR mostrou que as

células tratadas com miltefosina apresentaram redução significativa ou manutenção da carga parasitária.

Não foi observada uma correlação entre a taxa de infecção celular e o número estimado de formas amastigotas intracelulares mensurado por qPCR ($r=0,1608$; $p=0,6192$).

Tabela 9 – Concentração celular, percentual de células viáveis, percentual de infecção determinada por citometria de fluxo e carga parasitária por qPCR das células THP1 infectadas com as cepas isoladas de cães do experimento 5.8.1

Amostras	Número de células x $10^6/\text{mL} \pm \text{DP}$	Percentual de células viáveis (%)	Percentual de infecção (%)	Estimativa da carga Parasitária (Número de cópias/ngDNA)
THP1 inicial	4	100	-	-
THP1+ JACK_T0	0,50 \pm 0,04	12,50	42,05 \pm 13 ^a	135,05 \pm 18,35 ^a
THP1+ JACK_T0 + miltefosina	0,39 \pm 0,09	9,63	32,0 \pm 3,0 ^a	95,73 \pm 7,08 ^b
THP1+ JACK_T1	0,33 \pm 0,02	8,25	26,5 \pm 6,0 ^a	133,58 \pm 8,33 ^a
THP1+ JACK_T1+ miltefosina	0,34 \pm 0,02	8,44	25,85 \pm 2,0 ^a	54,96 \pm 7,99 ^b
THP1+ OTTO_T0	0,24 \pm 0,02	6,00	45,9 \pm 0,0 ^a	148,52 \pm 14,83 ^a
THP1+ OTTO_T0+ miltefosina	0,26 \pm 0,02	6,56	50,1 \pm 3,0 ^a	64,94 \pm 3,08 ^b
THP1+ OTTO_T1	0,24 \pm 0,06	6,00	39,9 \pm 7,0 ^a	71,03 \pm 9,56 ^a
THP1+ OTTO_T1+ miltefosina	0,24 \pm 0,03	5,97	34,6 \pm 0,0 ^a	69,28 \pm 3,63 ^a
THP1+ TCHOPO_T0	0,46 \pm 0,00	11,38	32,65 \pm 4,0 ^a	125,10 \pm 20,20 ^a
THP1+ TCHOPO_T0+ miltefosina	0,50 \pm 0,03	12,53	31,1 \pm 0,0 ^a	63,74 \pm 4,88 ^b
THP1+ TCHOPO_T1	0,62 \pm 0,10	15,59	29,75 \pm 8,0 ^a	84,44 \pm 7,47 ^a
THP1+ TCHOPO_T1+ miltefosina	0,36 \pm 0,02	9,06	23,9 \pm 11,0 ^a	71,30 \pm 12,38 ^a
THP1	1,38 \pm 0,04	34,38	-	-
THP1+ miltefosina	1,95 \pm 0,28	48,75	-	-

\pm DP: desvio padrão; %:percentual, (-): Não determinado. THP-1 + cepa: célula humana da linhagem monocitária infectada com a cepa; THP-1 + cepa + miltefosina: célula humana da linhagem monocitária infectada com a cepa tratada com miltefosina. Carga parasitária: determinada pelo número de cópias do gene DNA α polimerase por ng de DNA. As análises foram efetuadas pelo teste Two-way ANOVA e o teste de múltipla comparação de *Tukey's* ($p<0,05$), as variáveis consideradas foram: percentual de infecção e estimativa da carga parasitária. As comparações foram entre cada cepa tratada e não tratada com miltefosina, letras iguais não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$), letras diferentes apresentam diferenças significativas $p<0,05$.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.3.2 Proteômica das células THP-1 e formas amastigotas das cepas de *L. infantum* isoladas de cães

6.3.2.1 Extração e quantificação de proteínas das células THP-1 e das formas amastigotas intracelulares das cepas isoladas dos cães Jack, Otto e Tchopo

Na Tabela 10 está demonstrada as concentrações das proteínas obtida após a extração em solução com RapiGest 0,2% e dosagem utilizando o kit Qubit, das células THP1 infectadas e não infectadas, tratadas e não tratadas com miltefosina.

Tabela 10 – Concentração proteica das diferentes condições do experimento 5.8.1

Condição do experimento	Concentração de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
THP1 + JACK_T0	3,39 \pm 0,90
THP1 + JACK_T0 + miltefosina	3,52 \pm 0,50
THP1 + JACK_T1	4,23 \pm 0,45
THP1 + JACK_T1 + miltefosina	2,88 \pm 0,81
THP1 + OTTO_T0	2,97 \pm 0,06
THP1 + OTTO_T0 + miltefosina	2,84 \pm 0,41
THP1 + OTTO_T1	2,90 \pm 0,14
THP1 + OTTO_T1 + miltefosina	4,32 \pm 0,86
THP1 + TCHOPO_T0	2,91 \pm 0,14
THP1 + TCHOPO_T0 + miltefosina	3,21 \pm 0,29
THP1 + TCHOPO_T1	2,37 \pm 0,27
THP1 + TCHOPO_T1 + miltefosina	1,94 \pm 0,20
THP1	1,95 \pm 0,03
THP1 + miltefosina	1,93 \pm 0,10

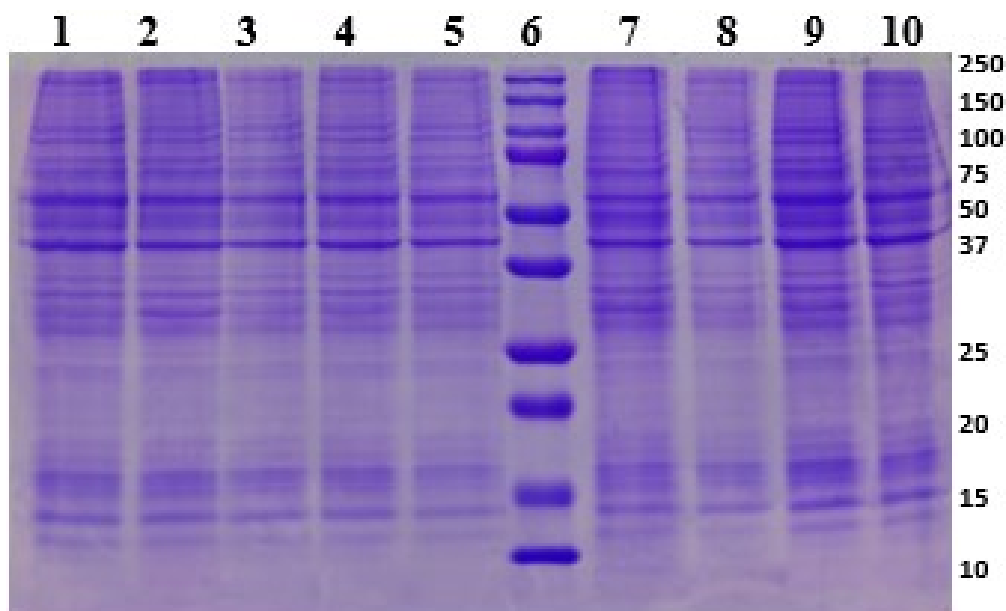
\pm DP: desvio padrão; THP-1 + cepa: célula humana da linhagem monocitária infectada com a cepa; THP-1 + cepa + miltefosina: célula humana da linhagem monocitária infectada com a cepa tratada com miltefosina.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.3.2.2 Eletroforese de poliacrilamida - SDS PAGE - das amostras submetidas a extração de proteínas

Na Figura 13 está representado o gel de poliacrilamida SDS PAGE 13% carregado com 10 a 20 µg de proteínas das amostras extraídas (Tabela 10). É possível observar que o perfil proteico das amostras apresentou um perfil homogêneo de bandas.

Figura 13 – Gel representativo do perfil proteico das amostras submetidas a extração de proteínas nas diferentes condições do experimento 5.8.1



Gel de poliacrilamida 13% - SDS PAGE, foram adicionados de 10 a 20 µg de proteína em cada poço, Linha 1: THP1 + JACK_T0 (10 µg de proteína); 2: THP1 + JACK_T0 + MIL (10 µg de proteína); 3: THP1 + JACK_T1 (10 µg de proteína); 4: THP1 + JACK_T1 + MIL (20 µg de proteína); 5: THP1 + JACK_T0 (10 µg de proteína); 6: Peso Molecular 250-10 kDa 7: THP1 + OTTO_T0 (10 µg de proteína); 8: THP1 + OTTO_T0 + MIL (10 µg de proteína); 9: THP1 + OTTO_T1 (20 µg de proteína); 10: THP1 + OTTO_T1 + MIL (20 µg de proteína),

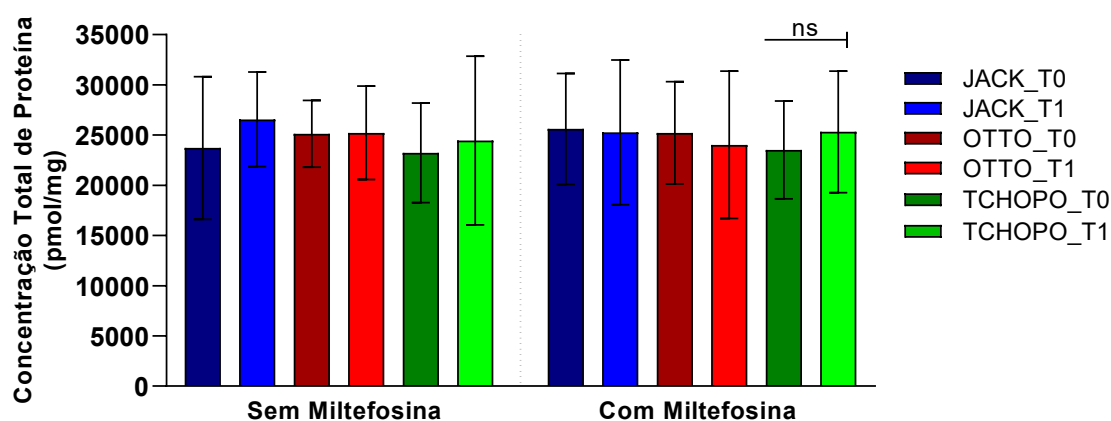
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.3.3 Análise dos dados do proteoma das formas amastigotas intracelulares das cepas isoladas dos cães Jack, Otto e Tchopo

Um total de 4.235 proteínas únicas de *Homo sapiens* e 494 proteínas únicas de *L. infantum* foram identificadas e validadas no proteoma total deste estudo. O presente trabalho concentrou-se na análise das 494 proteínas únicas identificadas nas

formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* das seis cepas tratadas e não tratadas com miltefosina (ANEXO D). Não se observou diferença na concentração total (Figura 14), bem como no total de proteína (TP) (dados não mostrados), entre as proteínas de *L. infantum* identificadas em amastigotas nas diferentes condições experimentais, sugerindo que o tratamento *in vitro* com a miltefosina não interferiu na concentração total e no conteúdo total de proteínas identificadas nas cepas analisadas.

Figura 14 – Distribuição da média da concentração de proteína total identificada no proteoma de amastigotas das seis cepas de *L. infantum* não tratadas e tratadas com miltefosina



Concentração de proteína total das replicatas biológicas do proteoma dos seis isolados de *L. infantum*. Todos os dados apresentaram-se normais pelo teste de Shapiro-Wilk e sem outliers pelo teste de ROUT. As análises foram efetuadas pelo teste ANOVA – One way, não pareado e teste de múltipla comparação de Tukey's. ns: não apresenta diferença significativa ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A distribuição das proteínas identificadas no proteoma total das formas amastigotas intracelulares e o percentual de infecção obtido pela citometria de fluxo, das seis cepas tratadas e não tratadas com miltefosina, estão representadas na Tabela 11. Encontrou-se uma correlação positiva ($r=0,8371$; $p=0,0007$) entre o percentual de infecção celular e o número de proteínas de *L. infantum* identificadas em cada cepa sem e com tratamento de miltefosina. Estes resultados sugerem que uma maior taxa de infecção (mesmo sem diferença significativa) proporcionou a identificação de um número maior de proteínas. A exposição das células infectadas ao fármaco não resultou em alteração significativa na taxa de infecção, na

concentração de proteína total (Figura 14) e no conteúdo de proteína total, apesar das variações no número de proteínas identificadas para cada cepa.

Tabela 41 – Percentual de infecção na linhagem THP-1, o número de proteínas de *L. infantum* identificadas no proteoma de amastigotas das cepas isoladas não tratados e tratados com miltefosina

Amostras	Sem miltefosina		Com miltefosina		Número total de proteínas únicas por cão
	Percentual de Infecção de THP-1 (M±DP) (%)	Número de proteínas	Percentual de Infecção de THP-1 (M±DP) (%)	Número de proteínas	
JACK_T0	42,05±13,93	329	32,00± 3,81	352	364
JACK_T1	26,50±6,93	316	25,85±2,61	281	
OTTO_T0	45,90±0,56	478	50,10±3,11	469	488
OTTO_T1	39,90±7,91	427	34,60±0,56	392	
TCHOPO_T0	32,65±4,60	384	31,10±0,85	342	391
TCHOPO_T1	29,75±8,41	342	23,90±11,87	325	
Total		2276		2161	494

*M: Média; DP: desvio padrão; %:percentual de infecção obtido pelo método de citometria de fluxo.

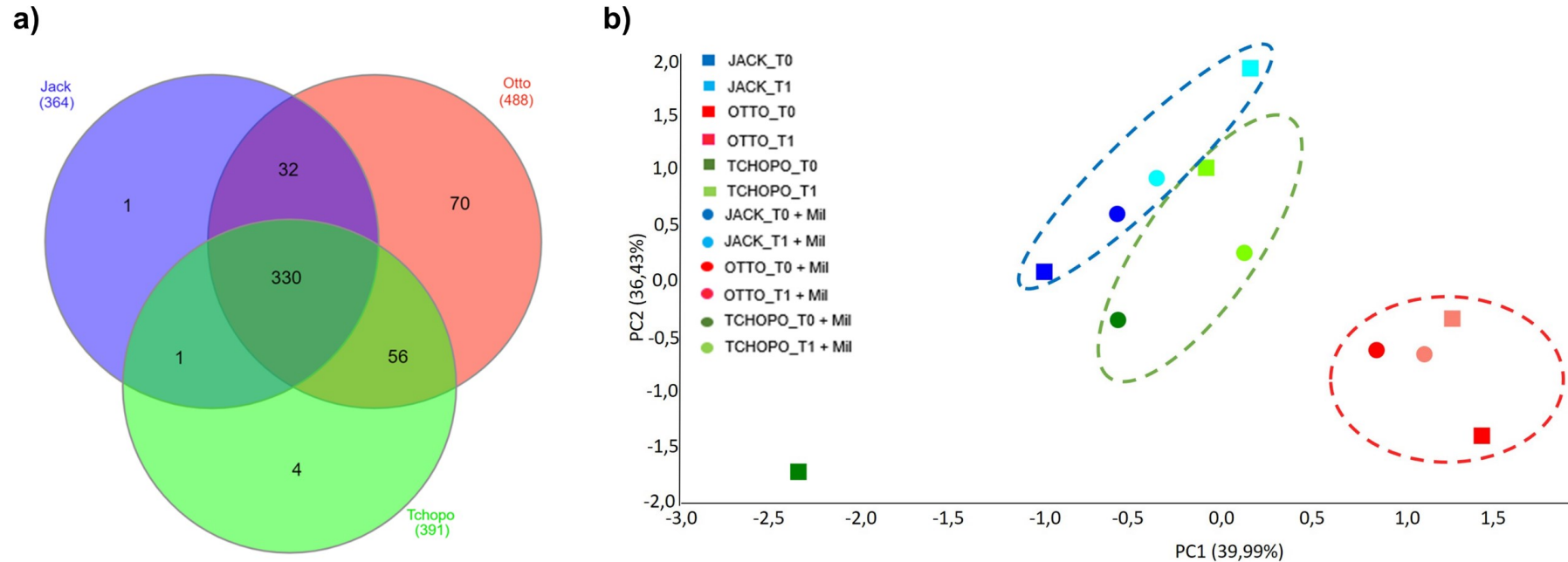
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.3.3.1 Análise comparativa do proteoma total de amastigotas das cepas isoladas de cães

Foram identificadas 364, 488 e 391 proteínas nas cepas isoladas dos cães Jack, Otto e Tchopo nas diferentes condições experimentais, totalizando 1.243 identificações que correspondem a 494 foram identificadas como proteínas únicas (Tabela 11). A figura 15a representa a distribuição das proteínas identificadas e mostra que 330 proteínas foram compartilhadas entre as cepas isoladas dos três cães estudadas.

O PCA mostra o perfil de distribuição do proteoma das cepas, tratadas e não tratadas com miltefosina (Figura 15b). A variância PC1 e PC2 que resolveu 76,42% da análise, mostrou que as características das proteínas identificadas nas cepas isoladas de cada cão, nas diferentes condições experimentais, permitiram por similaridade agrupá-las. O grupamento das cepas isoladas do cão Otto apresentou-se mais compacto e isolado, sugerindo que este comportamento se deva ao fato de que nas cepas isoladas deste cão foi identificado um número maior de proteínas.

Figura 15 – Diagrama *Venn* representando a distribuição das proteínas nas cepas isoladas do cão Jack, Otto e Tchopo e PCA do perfil de distribuição das proteínas identificadas nas amastigotas das cepas isoladas dos cães, tratadas e não tratadas *in vitro* com miltefosina



(a) Diagrama de *Venn* representa a distribuição das 1.243 proteínas identificadas nas cepas T0 e T1 tratada e não tratada com miltefosina isoladas de cada cão. As cepas isoladas do cão Jack (azul) 364 proteínas, cepas isoladas do cão Otto (vermelho) 488 proteínas e cepas isoladas do cão Tchopo (verde) 391 proteínas, desenvolvido no programa *InteractiVenn* (HEBERLE et al., 2015); (b) Gráfico de dispersão de PCA do conjunto dos dados: a média do somatório das replicatas do conteúdo total de proteína, da concentração total de proteína (pmol/mg) e dos valores de intensidade dos peptídeo das seis cepas tratadas e não tratadas com miltefosina utilizando o programa *PAST4* v.4.06 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Cepa + Mil: cepa tratada com miltefosina.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.3.3.2 Características qualitativas e quantitativas das proteínas únicas identificadas no proteoma total de amastigotas das cepas isoladas de cães

Das 494 proteínas únicas identificadas, 49% (n=242) possuem a nomenclatura não caracterizadas e putativa e/ou hipotética em sua descrição identificada por meio do banco de dados *UniProt* e reanotadas pela ferramenta *Annota*. A categorização em termos de GO das 494 proteínas únicas, mostrou que 94,33% (n=466) das proteínas foram classificadas pelo programa *FastProtein* e banco de dado *TriTrypDB*. Para 4,67% (n=23) foi possível obter a função utilizando a ferramenta *Annota* e os bancos de dados *PFAM*, *PANTHER* e *TriTrypDB*. Para 1,01% (n=5) das proteínas não foi possível obter a classificação de função em nenhum dos bancos de dados utilizados (Tabela 12).

Tabela 52 – Descrição das características das cinco proteínas sem classificação de função em nenhum dos bancos de dados utilizados

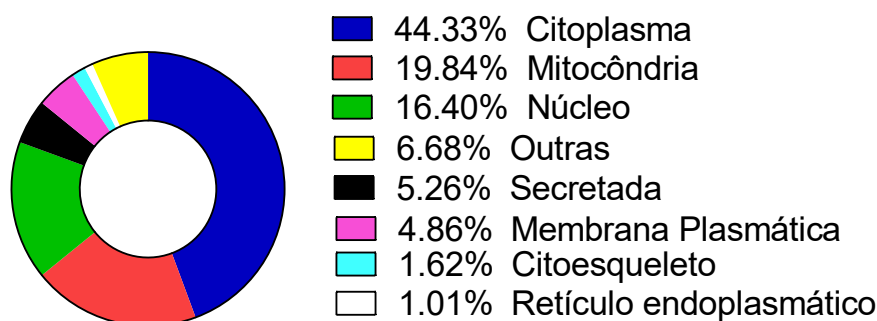
ID	Nome	Localização subcelular	Número do Cromossomo	Peso Molecular (kda)	Peptídeo sinal	Domínio de membrana
A4HTM6	NC	núcleo	8	32,56	Não	Não
A4I6M9	NC	núcleo	22	38,66	Não	Não
A4HZP6	NC	citoplasma	30	28,27	Não	Não
A4I5R1	NC	citoplasma	31	38,02	Não	Não
A4ICN7	NC	citoplasma	36	25,61	Não	Não

ID: Número de identificação da proteína no banco de dado *TriTrypDB* e *UniProt*. NC: não caracterizadas.

Fonte: Autora (2022).

A distribuição da localização subcelular das 494 proteínas únicas identificadas na análise proteômica está mostrada na Figura 16. A localização subcelular que se destaca é a citosólica.

Figura 16 – Distribuição das 494 proteínas únicas identificadas no proteoma das seis cepas de *L. infantum* de acordo com a localização subcelular.



O gráfico de pizza mostra a porcentagem de proteínas identificadas na análise do proteoma total (494) pertencentes a localização subcelular das seis cepas de *Leishmania infantum* dos três cães na forma amastigota intracelular tratados e não tratados com miltefosina.

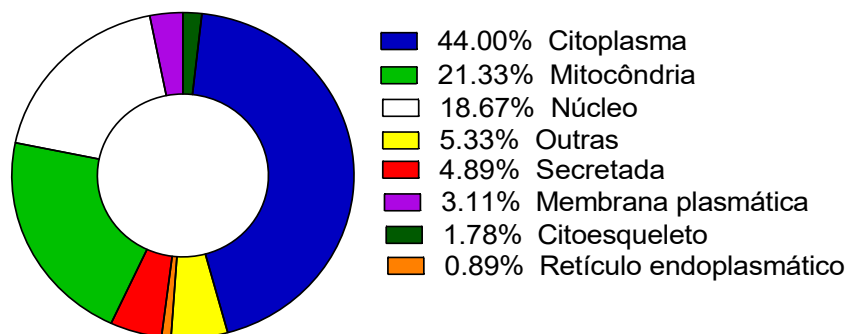
Fonte: Autora (2022).

Das 494 proteínas únicas do proteoma total, 2,02% (n=10) possuem peptídeo sinal. Destas, a localização subcelular em proteínas secretadas foi identificada em 40% (n=4), membrana celular 30% (n=3), retículo endoplasmático 20% (n=2) e mitocôndria 10% (n=1). As proteínas que possuem pelo menos um domínio transmembrana correspondem a 7,29% (n=36) do proteoma e destas, a maioria possui localização subcelular na membrana celular 47,22% (n=17), mitocôndria 16,66% (n=6) e proteínas secretadas 16,66% (n=6). As demais têm localização citoplasmática (n=3), no retículo endoplasmático (n=3) e nuclear (n=1).

6.3.4 Caracterização das proteínas únicas identificadas e compartilhadas entre amastigotas das cepas isoladas de cães

Das 330 proteínas compartilhadas entre as cepas isoladas dos três cães, 225 proteínas únicas (ANEXO D) foram compartilhadas entre as seis cepas tratadas e não tratadas com miltefosina. Destas, 1,80% (n=4) possuem peptídeo sinal e a localização subcelular que se destaca é o citoplasma (Figura 17). As proteínas que possuem pelo menos um domínio transmembrana correspondem a 6,22% (n=14) das proteínas, sendo que a Leishmanolisina - GP63 (A0A6L0WJL3) a que possui âncora de GPI.

Figura 17 – Distribuição das 225 proteínas únicas compartilhadas entre as seis cepas isoladas dos cães de acordo com a localização subcelular.



O gráfico de pizza mostra a percentagem das 225 proteínas únicas identificadas e compartilhadas em amastigotas das seis cepas de *Leishmania infantum* isoladas dos cães de acordo com a localização subcelular
 Fonte: Autora (2022).

6.3.4.1 Análise Funcional das proteínas compartilhadas entre amastigotas das cepas isoladas de cães baseada nas categorias componente celular, processo biológico e função molecular

A análise funcional das 225 proteínas únicas compartilhadas entre as seis cepas isoladas dos três cães (ANEXO D) baseada em categorização pelo GO revelou que as proteínas identificadas estão envolvidas em diversos processos celulares e de metabolismo. Estas proteínas compartilhadas foram classificadas nas três categorias: componente celular (30,12%), processo biológico (31,35%) e função molecular (38,53%).

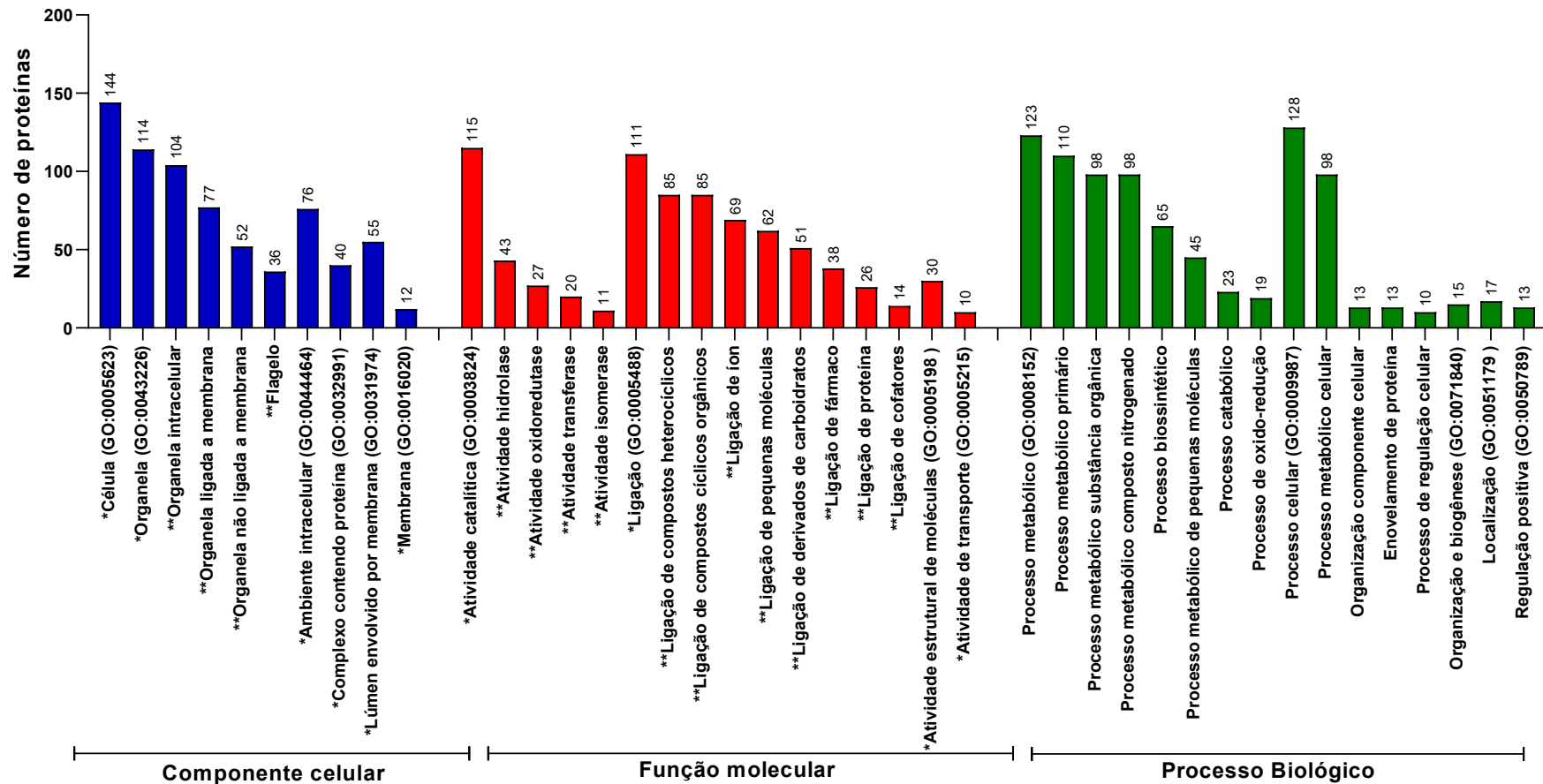
A categorização funcional pelos termos de GO relacionada à componentes celulares mais frequentes nas seis cepas tratadas e não tratadas com miltefosina foram as proteínas localizadas nas organelas (n=114) (Figura 18).

As proteínas classificadas na categoria de função molecular de acordo com os termos de GO estavam envolvidas na atividade catalítica (n=115) e de ligação (n=111). Com intuito de explorar as categorias de GO que se destacaram na categoria de função molecular, efetuou-se a análise mais aprofundada das

atividades catalíticas e de ligação. Pode-se observar que a maior representatividade na atividade catalítica foram as atividades de hidrolase (n=43), oxidoreductase (n=21) e transferase (n=20). Em relação a maior representatividade na subcategoria de atividade de ligação foi identificado as atividades de ligação de compostos heterocíclicos (n=85), de compostos orgânicos cíclicos (n=85) e ligação de íons (n=69) (Figura 18).

Por fim, a categorização funcional das proteínas em processo biológico de acordo com os termos de GO predominantemente categorizou em processo metabólico (n=123) e processo celular (n=128) (Figura 35). Pode-se observar que o maior percentual das proteínas inseridas nos termos de GO da subcategoria processo metabólico se distribuíram em processo metabólico primário (n=110), metabolismo de substâncias orgânicas (n=98) e metabolismo de compostos nitrogenados (n=98). Em relação a subcategoria de processo celular a maior representatividade foi observada no processo metabólico celular (n=96), na organização de componentes celulares (n=13) e no enovelamento de proteínas (n=13) (Figura 18).

Figura 18 – Distribuição das 225 proteínas únicas compartilhadas entre amastigotas das cepas isoladas de cães tratados e não tratados com miltefosina, classificadas pelos termos de GO.



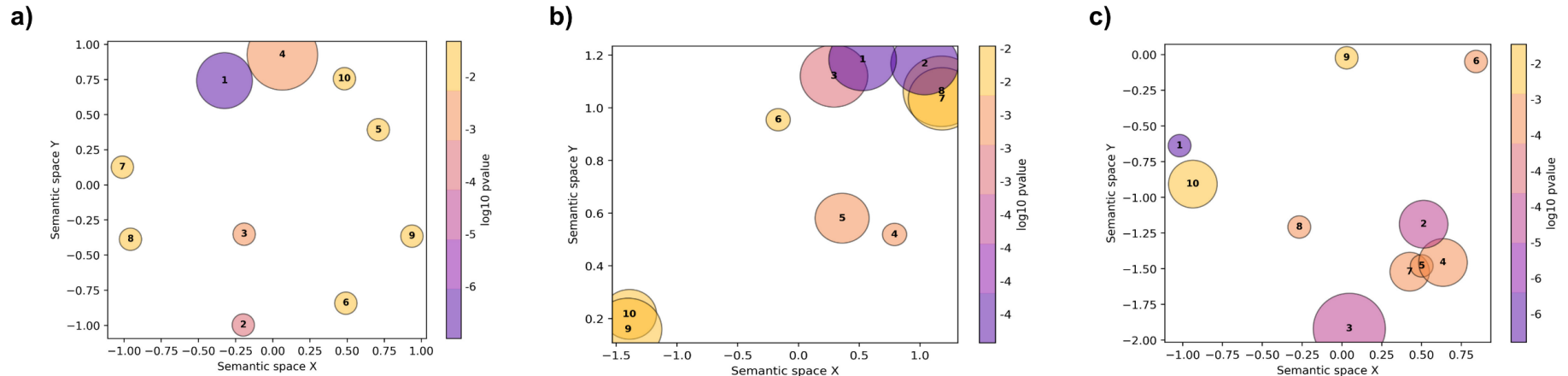
Número de proteínas de *Leishmania infantum* identificadas em formas amastigotas intracelulares dos seis isolados dos três cães tratados e não tratados com miltefosina, distribuídas nos termos de GO nas categorias funcionais (*) do componente celular, função molecular e processo biológico e suas subcategorias

funcionais (**) caracterizadas pelo programa *WEGO* de acordo com as assinaturas de GO. Foram retiradas do gráfico os termos de GO com menos de 10 proteínas. Eixo y mostra o número de proteínas em cada categoria de GO, números acima das barras indicam o número de proteínas em cada categoria de GO, no eixo x as assinaturas de GO.
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.3.4.2 Análise de enriquecimento funcional das proteínas compartilhadas entre cepas isoladas dos cães baseadas nas categorias componente celular, processo biológico e função molecular

Das 225 proteínas únicas compartilhadas entre as seis cepas tratadas e não tratadas com miltefosina, foram identificados 209 genes ortólogos. Destes, foram enriquecidos 15 termos de GO no componente celular, os quais foram resumidas pelo *GO-Figure!* destacando as proteínas localizadas no glicossoma e proteínas presentes em organelas envolvidas por membrana celular (Figura 19a). Na categoria de função molecular 56 termos de GO foram enriquecidos e resumidos pelo *GO-Figure!* destacando-se as proteínas envolvidas em funções moleculares de ligação de nucleotídeo e atividade carboxipeptidase (Figura 19b). Oitenta e dois termos de GO foram enriquecidos na categoria de processo biológico e resumidos pelo *GO-Figure!* destacando as proteínas envolvidas no metabolismo de carboidrato, de nucleotídeos e processo catabólico (Figura 19c).

Figura 19 – Distribuição nos termos de GO enriquecidos das proteínas nas categorias de componente celular função molecular e processo biológico compartilhadas entre amastigotas das cepas isoladas de cães



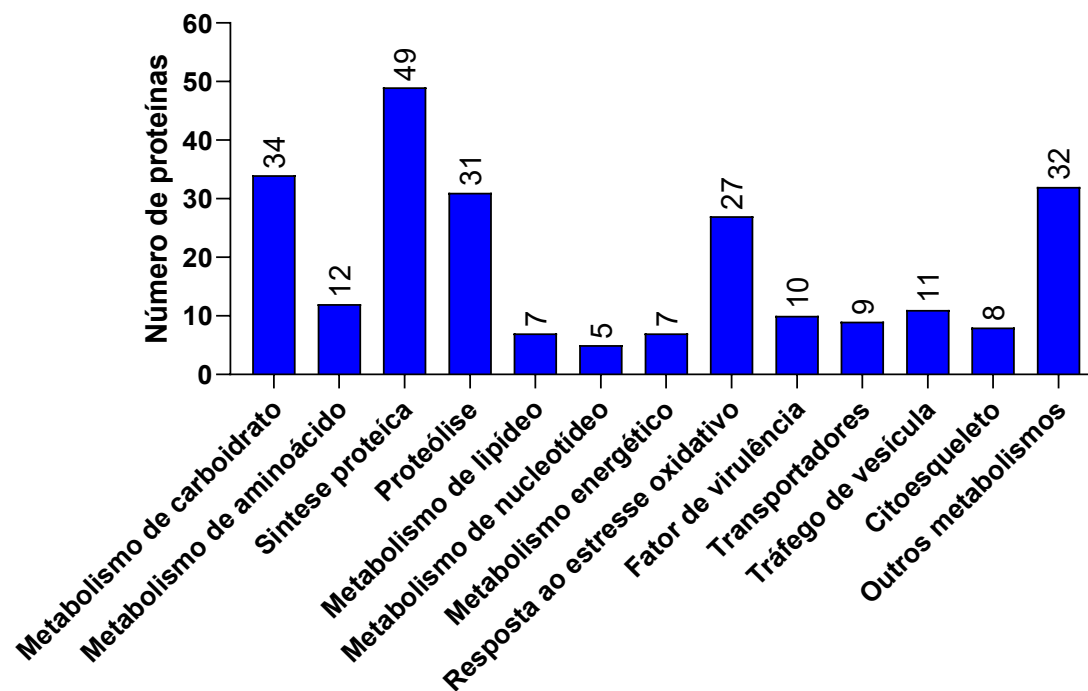
Das 225 proteínas compartilhadas entre as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania infantum* nas seis cepas isoladas de cães, tratadas e não tratadas com miltefosina, identificou-se 209 genes ortólogos que foram resumidos em termos de GO pelo *GO-Figure!* Semantic space Y e X significa espaço limite de similaridade semântica dos termos de GO, as cores dos círculos são baseadas no valor de p ($p < 0,05$), representado em $\log(p\text{valor})$. O tamanho dos círculos representa o número de termos de GO. (a) Os algarismos arábicos representam a distribuição dos 10 principais termos de GO na categoria de componente celular: 1. Glicossoma 2. Citoplasma, 3. Citosol, 4. Organela intracelular, 5. Grânulo de ribonucleoproteína, 6. Nucleoplasma, 7. Fator de alongamento de tradução eucariótica, 8. complexo de proceossoma, 9. Membrana do retículo endoplasmático e 10. Citoesqueleto cortical; (b) Os algarismos arábicos representam a distribuição dos 10 principais termos de GO na categoria de função molecular: 1. Ligação, 2. Ligação de nucleotídeo, 3. Ligação de íons, 4. Ligação de NAD, 5. ligação de NADH. 6. Ligação de proteína, 7. Ligação de ribonucleotídeo de adenina e 8. Ligação de ribonucleotídeo de purina, 9. Atividade de metalocarboxipeptidase e 10. Atividade de carboxipeptidase; (c) Os algarismos arábicos representam a distribuição dos 10 principais termos de GO na categoria de processo biológico: 1. Metabolismo de carboidrato, 2. Metabolismo de purina ribonucleotídeo difosfato, 3. Processo glicolítico, 4. Processo metabólico de purina ribonucleotídeo, 5. Processo metabólico de nucleotídeo de purina, 6. Processo catabólico de substância orgânica, 7. Processo metabólico de nucleotídeos, 8. Processo catabólico de pequenas moléculas, 9. Proteólise e 10. Gliconeogênese.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.3.4.3 Análise dos grupos funcionais das proteínas compartilhadas das cepas isoladas de cães baseada em dados da literatura

As 225 proteínas únicas compartilhadas entre as seis cepas tratadas e não tratadas com miltefosina foram classificadas nos 13 principais grupos funcionais de acordo com o processo biológico ao qual pertencem: metabolismo de carboidrato, metabolismo de aminoácido, síntese proteica, proteólise, metabolismo de lipídeo, metabolismo de nucleotídeo, metabolismo energético, resposta ao estresse oxidativo, fator de virulência, transportadores, tráfego de vesícula, citoesqueleto e outros metabolismos, de acordo com dados encontrados da literatura (Figura 20).

Figura 20 – Distribuição das 225 proteínas únicas entre as seis cepas isoladas de cães tratadas e não tratadas com miltefosina, nos principais grupos funcionais, baseados em dados da literatura



Distribuição das 225 proteínas únicas compartilhadas entre os amastigotas das seis cepas tratadas e não tratadas com miltefosina nos principais grupos funcionais em *Leishmania* spp encontrados na literatura (PAAPE; AEBISCHER, 2011; BIYANI; MADHUBALA, 2012; LYNN; MARR; MCMASTER, 2013; PIRES et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; JARDIM et al., 2018; TASBIHI et al., 2019; FIALHO-JUNIOR et al., 2021; ASHRAFMANSSOURI; AMIRI-DASHATAN; AHMADI, 2022; COTARZZO et al. 2022; PACAKOVA et al., 2022; SANCHIZ et al., 2020; TANO et al., 2022). Números acima das barras indicam o número de proteínas em cada grupo funcional, podendo a proteína estar classificada em dois ou mais grupos. O eixo y representa o número de proteínas e o eixo x a distribuição dos grupos funcionais de acordo com os dados da literatura.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

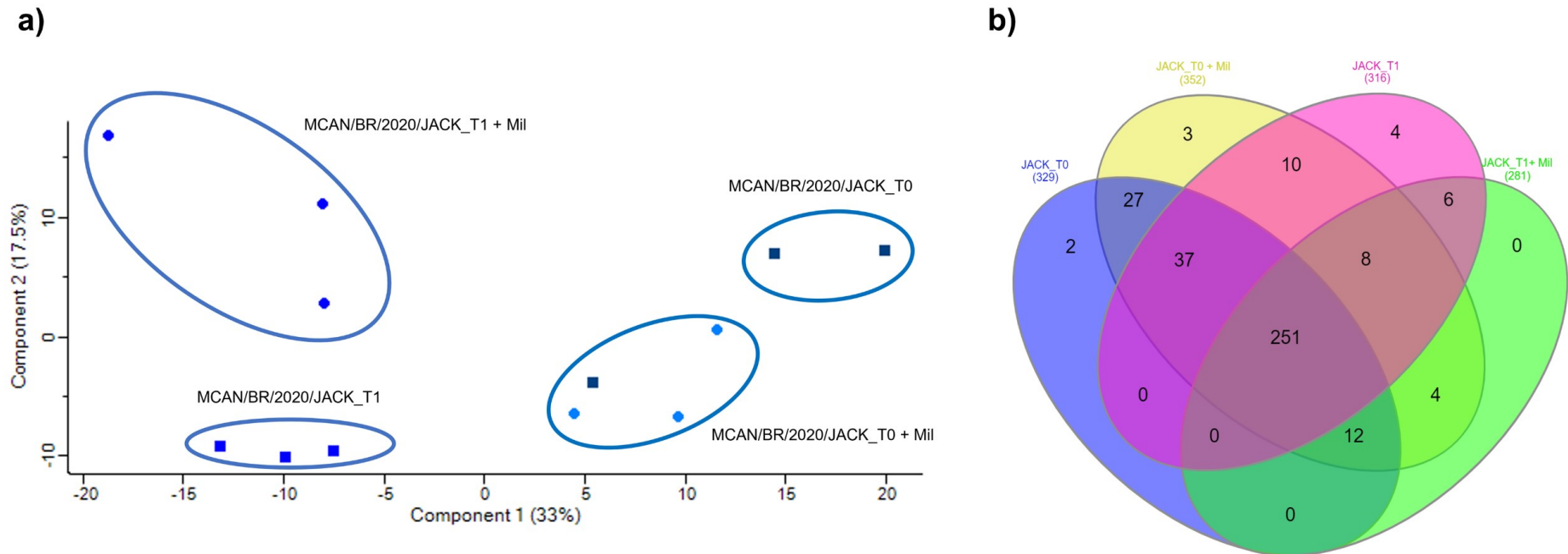
6.3.5 Análise comparativa do proteoma de amastigotas das cepas isoladas do cão Jack

6.3.5.1 Análise das proteínas identificadas nas formas amastigotas das cepas isoladas no cão Jack

A análise de PCA foi realizada para estabelecer se o proteoma das cepas isoladas do cão Jack (T0 e T1) tratadas e não tratadas com miltefosina, agruparam as replicatas de cada cepa de forma estatisticamente significativa. Estas foram separadas em quatro grupos distintos (Figura 21a). Sugerindo que os quatros grupos formados pelas duas cepas, quando tratadas e não tratadas com miltefosina se relacionem a variações na distribuição do número de proteína identificada entre as cepas.

No diagrama de *Venn* observa-se a distribuição das 1.278 proteínas identificadas nas cepas isoladas do cão Jack, 329 e 352 foram identificadas na cepa JACK_T0 e 316 e 281 na cepa JACK_T1, não tratada e tratada com miltefosina, respectivamente (Tabela 11). Das 364 proteínas únicas encontradas nas cepas isoladas do cão Jack, nas diferentes condições experimentais, 69% (n=251) das proteínas foram compartilhadas (Figura 21b).

Figura 21 – PCA e diagrama de *Venn* da distribuição das proteínas identificadas nas cepas isoladas do cão Jack



(a) No PCA está representado a reprodutibilidade e uniformidade das triplicatas, o agrupamento das três replicatas biológicas para cada cepa tratada e não tratada com miltefosina. A cepa JACK_T0 (quadrante superior direito – quadrado azul-escuro), a cepa JACK_T0 tratada com miltefosina (quadrante inferior direito- círculo azul escuro), a cepa JACK_T1 (quadrante inferior esquerdo- quadrado azul claro) e a cepa JACK_T1 tratada com miltefosina (quadrante superior esquerdo- círculo azul claro), efetuou-se o PCA no programa *Perseus* v.2.0.6.0 (TYANOVA et al., 2016); (b) O diagrama de *Venn* mostra a distribuição das 1.278 proteínas identificadas nos isolados do cão Jack. Cepa JACK_T0 (azul) 329 proteínas, cepa JACK_T0 + Mil (tratada com miltefosina (amarelo), 352 proteínas, cepa JACK_T1 (rosa) 316 proteínas e a cepa JACK_T1 + Mil (tratada com miltefosina) (verde), desenvolvido no programa *InteractiVenn* (HEBERLE et al., 2015), disponível on line.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.3.5.2 *Análise da abundância de proteínas diferencialmente expressas nas cepas JACK_T0 e JACK_T1 tratadas e não tratadas com miltefosina*

A análise de abundância diferencial das 288 proteínas compartilhadas entre as cepas JACK_T0 *versus* JACK_T1 mostrou diferença significativa na abundância em 59 proteínas (ANEXO D). Destas 27 proteínas mostraram um aumento significativo na cepa JACK_T0 e 32 proteínas na cepa JACK_T1 (Figura 22a).

A comparação das 265 proteínas compartilhadas entre as cepas JACK_T1 *versus* JACK_T1 tratada com miltefosina, mostrou diferença significativa na abundância em três proteínas. As proteínas (A4HRU8 e A4HWB9) apresentaram maior abundância na cepa JACK_T1. Contudo, nestas proteínas não foi detectado enriquecimento funcional significativo. Já a proteína (A4I5C0) mostrou abundância significativa na cepa JACK_T1 tratada, e o enriquecimento funcional da proteína mostrou envolvimento no metabolismo de nucleotídeo.

As análises de abundância diferencial das 327, 275 e 263 proteínas compartilhadas entre as cepas JACK_T0 *versus* JACK_T0 tratadas com miltefosina, respectivamente; JACK_T0 *versus* JACK_T1 e JACK_T0 *versus* JACK_T1 tratadas com miltefosina, respectivamente, não mostraram diferença significativa.

6.3.5.3 *Análise funcional e enriquecida das proteínas com diferença na abundância entre as cepas JACK_T0 e JACK_T1 baseada nas categorias de GO*

Identificou-se 27 proteínas com abundância aumentada na cepa JACK_T0 distribuídas na categoria do componente celular (25,53%), no processo biológico (34,04%) e na categoria função molecular (40,43%). Na cepa JACK_T1, 32 proteínas apresentaram abundância aumentada, sendo 28,57% delas na categoria componente celular, 31,43% no processo biológico e 40% na função molecular.

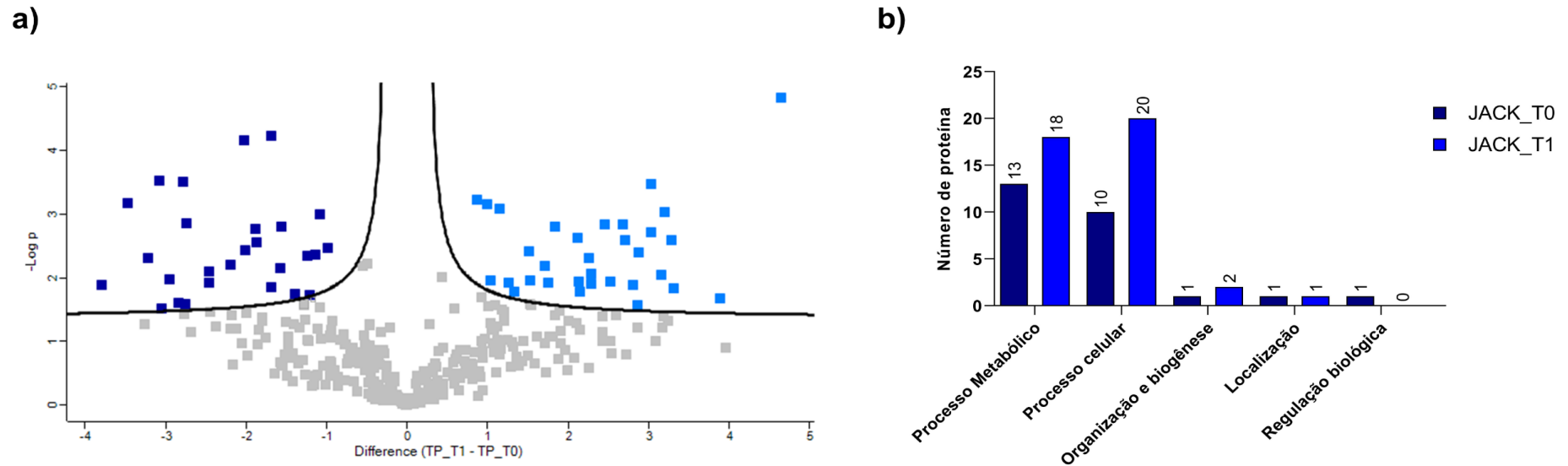
A classificação funcional baseada na categoria de processo biológico das proteínas mais abundantes nas cepas JACK_T0 e JACK_T1, distribuiu-se

em cinco subcategorias: processo metabólico, processo celular, organização e biogênese celular, localização e regulação biológica para a cepa JACK_T0 e em quatro principais categorias: processo metabólico, processo celular, organização e biogênese celular e localização para a cepa JACK_T1 (Figura 22b).

Nas 27 proteínas mais abundantes da cepa JACK_T0, 24 genes ortólogos foram encontrados e destes, foram enriquecidos seis termos de GO na categoria de componente celular, os quais foram resumidos pelo *GO-Figure!* destacando as proteínas localizadas no glicossoma. Em relação a categoria de processo biológico, 11 termos de GO foram enriquecidos e resumidos a um termo, destacando-se proteínas envolvidas em processos glicolíticos. Não houve enriquecimento de termos de GO na categoria de função molecular.

Nas 32 proteínas mais abundantes na cepa JACK_T1, foram encontrados 29 genes ortólogos que foram enriquecidos em quatro termos de GO resumidos a um termo na categoria de componente celular destacando-se proteínas localizadas no citoplasma. Nenhum termo de GO enriquecido foi encontrado nas categorias de processo biológico e função molecular.

Figura 22 – Gráfico de volcano representando a análise de abundância diferencial, categorização funcional de processo biológico e distribuição dos termos de GO enriquecidos na categoria de componente celular das 59 proteínas diferenciais das cepas JACK_T0 versus JACK_T1



(a) Gráfico Volcano para análise de dispersão, os quadrados azuis escuros representam as proteínas com maior abundância na cepa JACK_T0 (n=27) e os quadrados azuis claros representam as proteínas com maior abundância no isolado JACK_T1 (n=32). Os quadrados incolores representam proteínas que não mostraram diferença na abundância. Os valores representam a média do total do conteúdo de proteínas de no mínimo duas replicatas para cepa. Valores significativos foram determinados pelo teste *Student t* com FDR 0,05 e $s=0,1$. No gráfico $-\text{Log}(p) = -\text{Log}(\text{FDR})$; determina o limite de detecção e a diferença $(\text{TP}_T1 - \text{TP}_T0) = \log(s)$, utilizando o programa *Perseus* v.2.0.6.0 (TYANOVA et al., 2016); (b) Distribuição das 59 proteínas com diferença de abundância entre as cepas JACK_T0 e JACK_T1 identificadas na categoria funcional de processo biológico caracterizadas pelo programa *WEGO* de acordo com as assinaturas de GO. Números acima das barras indicam o número de proteínas em cada categoria de GO. O eixo y representa o número de proteínas e o eixo x a distribuição das assinaturas de GO.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.3.5.4 Características qualitativas e quantitativas, análise funcional e enriquecida baseada nas categorias de GO da proteína identificada exclusivamente nas cepas isoladas do cão Jack

A proteína Galactosiltransferase β 1,3,5 fosfoglicana (A0A6L0XL35) foi identificada exclusivamente nas cepas JACK_T0 tratada e não tratada com miltefosina. Esta proteína, possui localização subcelular na mitocôndria e atividade de proteólise. Não possui domínio transmembrana e peptídeo sinal (ANEXO D), e a análise funcional mostrou que a proteína possui componente celular localizado no citoplasma e membrana flagelar. Esta proteína não apresentou enriquecimento funcional em nenhuma categoria.

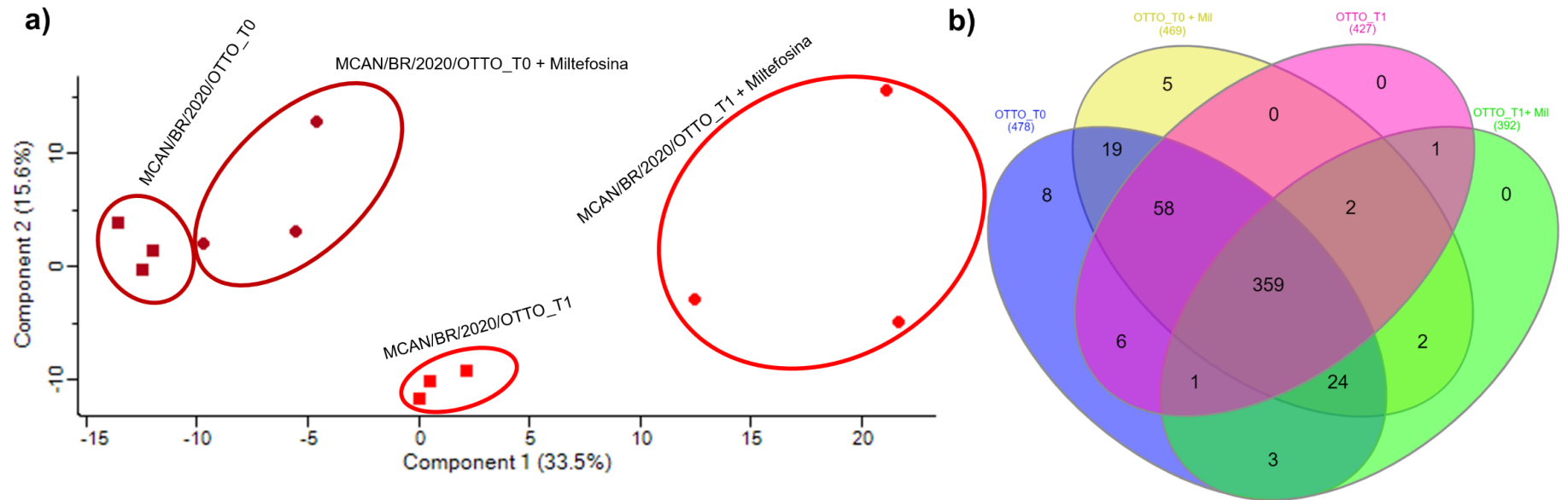
6.3.6 Análise comparativa do proteoma de amastigotas das cepas isoladas do cão Otto

6.3.6.1 Análise das proteínas identificadas nas formas amastigotas das cepas isoladas no cão Otto

Realizou-se a análise de PCA para estabelecer se o proteoma das cepas isoladas do cão Otto (T0 e T1) tratadas e não tratadas com miltefosina, agruparam as replicatas de cada cepa de forma estatisticamente significativa. Estas foram separadas em quatro grupo distintos (Figura 23a). Sugerindo que os quatros grupos formados pelas duas cepas, quando tratadas e não tratadas com miltefosina se relacionem a variações na distribuição do número de proteína identificada entre as cepas.

No diagrama de *Venn* observa-se a distribuição das 1.766 proteínas identificadas nas cepas isoladas do cão Otto, 478 e 427 proteínas foram identificadas na cepa OTTO_T0, 469 e 392 proteínas na cepa OTTO_T1 não tratada e tratada, respectivamente (Tabela 11). Das 488 proteínas únicas encontradas nas cepas isoladas do cão Otto, nas diferentes condições experimentais, 73,6% (n= 359) das proteínas foram compartilhadas (Figura 23b).

Figura 23 – PCA e diagrama de *Venn* da distribuição das proteínas identificadas nas cepas isoladas do cão Otto.



(a) No PCA está representado a reprodutibilidade e uniformidade das triplicatas, o agrupamento das três replicatas biológicas para cada cepa tratada e não tratada com miltefosina. A cepa OTTO_T0 (quadrante inferior esquerdo- quadrados vermelhos escuros), a cepa OTTO_T0 tratada com miltefosina (quadrante superior esquerdo- círculos vermelhos escuros), a cepa OTTO_T1 (quadrante inferior direito - quadrados vermelhos claros) e a cepa OTTO_T1 tratada com miltefosina (quadrante superior direito- círculos vermelhos claros), efetuou-se o PCA no programa *Perseus* v.2.0.6.0 (TYANOVA, et al. 2016); (b) Distribuição das 1.766 proteínas identificadas nos isolados do cão Otto. A cepa OTTO_T0 (azul) 478 proteínas, a cepa, OTTO_T0 + Mil: tratada com miltefosina (amarelo) 469 proteínas, a cepa OTTO_T1 (rosa) 427 proteínas e a cepa OTTO_T1+ Mil: tratada com miltefosina (verde) 392 proteínas, desenvolvido no programa *InteractiVenn* (HEBERLE et al., 2015), disponível on line.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

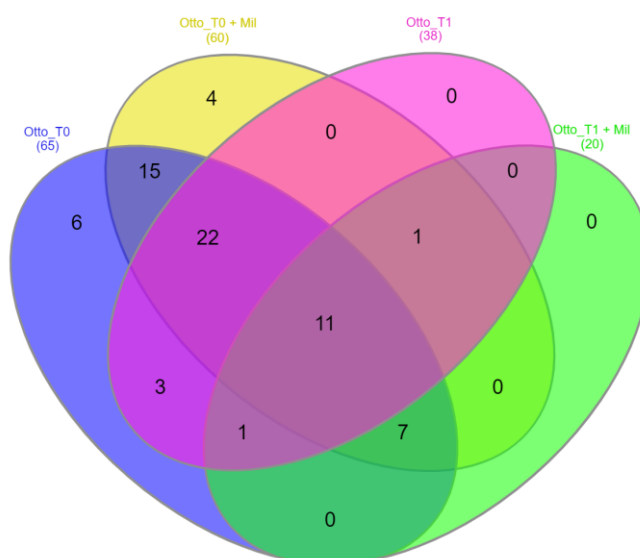
6.3.6.2 Análise da abundância de proteínas diferencialmente expressas nas cepas OTTO_T0 e OTTO_T1 tratadas e não tratadas com miltefosina

Realizou-se a análise de abundância diferencial entre as cepas OTTO_T0 e OTTO_T1 tratadas e não tratadas com miltefosina (item 5.8.1.12). Esta análise das proteínas 460, 387, 424, 363 e 387 compartilhadas entre as cepas OTTO_T0 *versus* OTTO_T0 tratada com miltefosina, cepas OTTO_T0 *versus* OTTO_T0 ambas tratadas com miltefosina, cepas OTTO_T0 *versus* OTTO_T1, cepas OTTO_T1 *versus* OTTO_T1 tratada com miltefosina e cepas OTTO_T0 *versus* OTTO_T1 tratada com miltefosina, respectivamente, não mostraram diferenças na abundância entre as proteínas.

6.3.5.3 Caracterização, análise funcional enriquecida das proteínas identificadas exclusivamente nas cepas isoladas do Cão Otto baseada nas categorias de GO

Das 183 proteínas totais, sendo 70 proteínas únicas (ANEXO D), identificadas exclusivamente entre as cepas isoladas do cão Otto, 11 proteínas foram compartilhadas entre as cepas (Figura 24).

Figura 24 – Diagrama de Venn representando a distribuição das proteínas identificadas nas cepas isoladas do cão Otto



*Distribuição das 183 proteínas identificadas nos isolados do cão Otto. Cepa OTTO_T0 (azul) 65 proteínas, cepa OTTO_T0+ Mil tratada com miltefosina (amarelo) 60 proteínas, cepa OTTO

_T1 (rosa) 38 proteínas e cepa OTTO _T1 + Mil (tratada com miltefosina) (verde) 20 proteínas, desenvolvido utilizando o programa *InteractiVenn* (HEBERLE et al., 2015), disponível on line.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Das 11 proteínas exclusivamente identificadas e compartilhadas entre os dois isolados do cão Otto (T0 e T1) tratados e não tratados com miltefosina, uma proteína possui domínio de transmembrana (E9AHV6) e nenhuma possui peptídeo sinal. A localização subcelular destas proteínas mostrou que 54,54% estão no citoplasma, 18,18% no núcleo e 27,28% em outros compartimentos. Para as 11 proteínas, identificou-se 11 genes ortólogos e nenhum termo de GO foi enriquecido em nenhuma das três categorias.

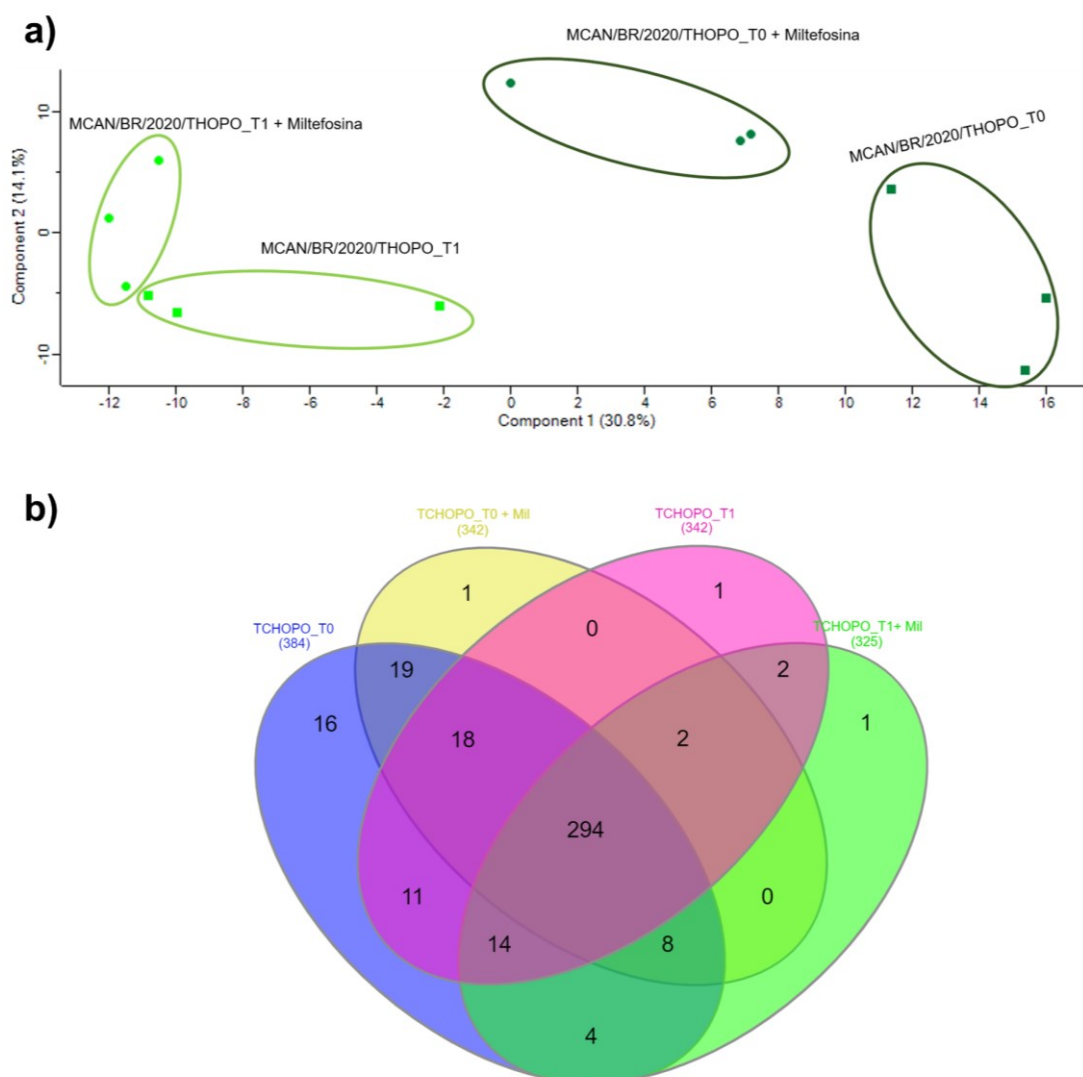
6.3.7 Análise comparativa do proteoma de amastigotas das cepas isoladas do cão Tchopo

6.3.7.1 Análise das proteínas identificadas nas formas amastigotas das cepas isoladas no cão Tchopo

A análise de PCA foi realizada para estabelecer se o proteoma das cepas isoladas do cão Tchopo (T0 e T1) tratadas e não tratadas com miltefosina, agruparam as replicatas de cada cepa de forma estatisticamente significativa. Estas foram separadas em quatro grupo distintos (Figura 25a). Sugerindo que os quatros grupos formados pelas duas cepas, quando tratadas e não tratadas com miltefosina se relacionem a variações no número de proteínas identificadas nas cepas.

No diagrama de *Venn* observa-se a distribuição das 1.393 proteínas identificadas nas cepas isoladas do cão Tchopo, 384 e 342 foram identificadas na cepa TCHOPO_T0 e 342 e 325 na cepa TCHOPO_T1 não tratados e tratados com miltefosina, respectivamente (Tabela 11). Das 391 proteínas únicas encontradas nas cepas isoladas do cão Tchopo, nas diferentes condições experimentais, 75,2% (n= 294) das proteínas foram compartilhadas (Figura 25b).

Figura 25 – PCA e diagrama de *Venn* da distribuição das proteínas identificadas nas cepas isoladas do cão Tchopo



(a) No PCA está representado a reprodutibilidade e uniformidade das triplicatas, o agrupamento das três replicatas biológicas para cada cepa tratada e não tratada com miltefosina. A cepa TCHOPO_T0 (quadrante inferior direito- quadrado verde escuro), a cepa TCHOPO_T0 tratada com miltefosina (quadrante superior direito- círculo verde escuro), a cepa TCHOPO_T1 (quadrante inferior esquerdo- quadrado verde claro) e a cepa TCHOPO_T1 tratada com miltefosina (quadrante superior esquerdo- círculo verde claro). Efetuou-se o PCA no programa Perseus v.2.0.6.0 (TYANOVA et al., 2016); (b) Distribuição das 1.393 proteínas identificadas nas cepas isoladas do cão Tchopo. A cepa TCHOPO_T0 (azul) 384 proteínas, cepa TCHOPO_T0 + Mil (tratada com miltefosina) (amarelo) 342 proteínas, cepa TCHOPO_T1 (rosa) 342 proteínas e a cepa TCHOPO_T1+ Mil (tratada com miltefosina) (verde) 325 proteínas, desenvolvido no programa *InteractiVenn* (HEBERLE et al., 2015), disponível on line.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

6.3.7.2 *Análise da abundância, análise funcional e enriquecida das proteínas diferencialmente expressas nas cepas TCHOPO_T0 e TCHOPO_T1 tratadas e não tratadas com miltefosina*

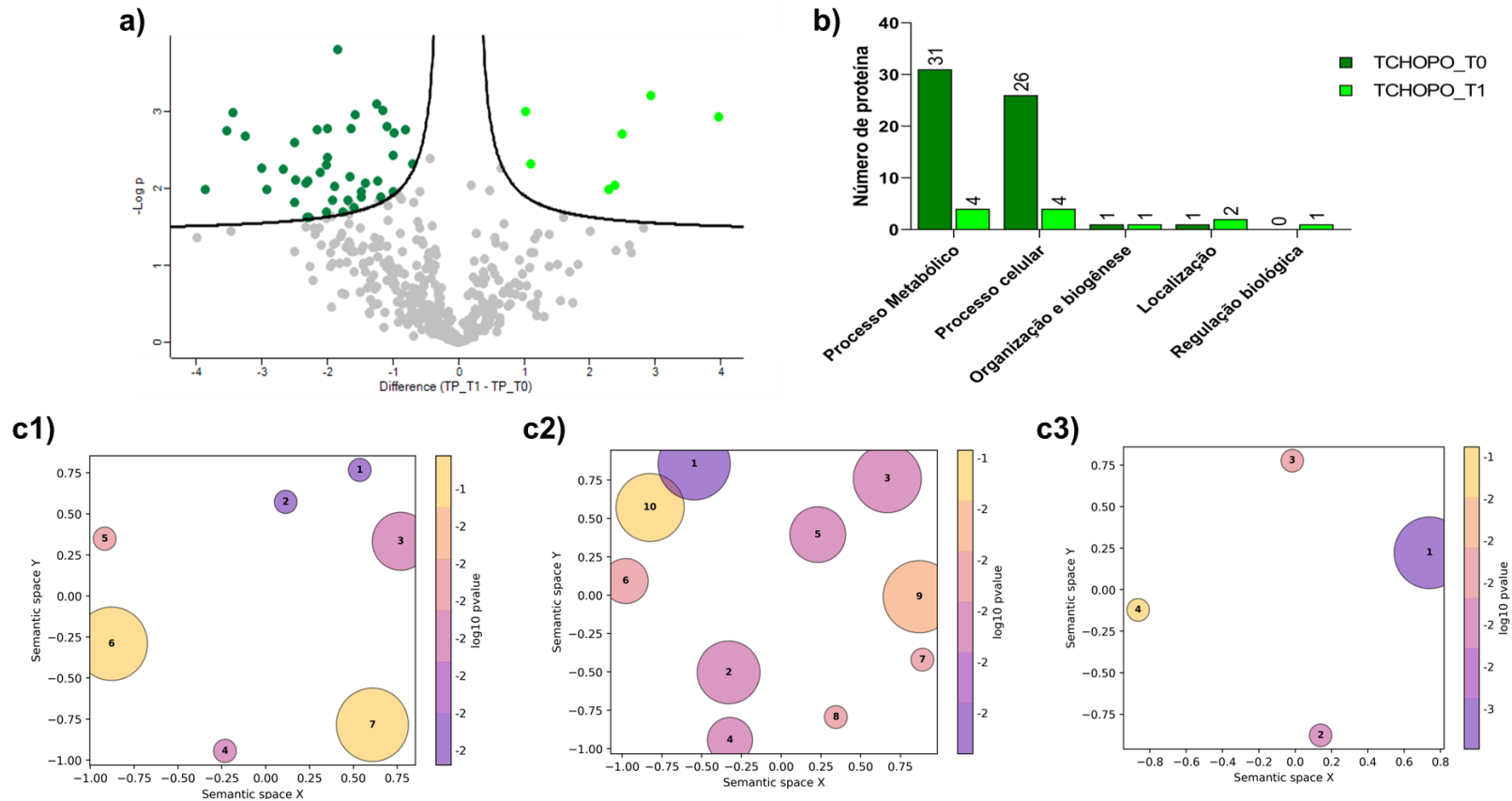
A análise de abundância diferencial das 337 proteínas compartilhadas entre os isolados TCHOPO_T0 e TCHOPO_T1 mostrou diferença significativa na abundância em 52 proteínas (ANEXO D). Quarenta e cinco proteínas mostraram um aumento significativo na cepa TCHOPO_T0 e 7 proteínas na cepa TCHOPO_T1 (Figura 26a).

As comparações das 339, 304, 312 e 320 proteínas compartilhadas entre as cepas TCHOPO_T0 *versus* TCHOPO_T0 tratada; TCHOPO_T0 *versus* TCHOPO_T1 tratadas com miltefosina; TCHOPO_T1 *versus* TCHOPO_T1 tratada com miltefosina e TCHOPO_T0 *versus* TCHOPO_T1 tratada com miltefosina, respectivamente, não mostraram diferenças na abundância entre as proteínas. As 45 proteínas abundantes na cepa TCHOPO_T0 distribuíram-se nas categorias componente celular (22,45%), processo biológico (35,71%) e função molecular (41,84%).

As proteínas classificadas na categoria processo biológico foram agrupadas em quatro subcategorias com base nos termos de GO (Figura 26b). A análise de enriquecimento das 45 proteínas, revelou 41 genes ortólogos. Destes, foram enriquecidos 13 termos de GO na categoria de componente celular, com destaque as proteínas localizadas no flagelo e na matrix flagelar (Figura 26c1). Trinta e sete termos de GO foram enriquecidos na categoria de função molecular destacando-se as proteínas envolvidas com as funções moleculares de atividade antioxidante e proteínas com função de ligação (Figura 26c2). Dezesete termos de GO foram enriquecidos na categoria de processo biológico destacando-se as proteínas envolvidas na biossíntese de farnesil difosfato (ergosterol), metabolismo de colesterol e metabolismo de organofosforado (Figura 26c3).

As sete proteínas com abundância significativa aumentada na cepa TCHOPO_T1 distribuíram-se nas categorias componente celular (27,27%), processo biológico (45,45%) e função molecular (27,27%). Sete proteínas da cepa TCHOPO_T1 distribuíram-se nas cinco principais categorias (Figura 26b).

Figura 26 – Gráfico de vulcano representando a análise de dispersão de proteínas, distribuição das 52 proteínas com diferença na abundância na categoria funcional de processo biológico e distribuição dos termos de GO enriquecidos na categoria de componente celular das cepas TCHOPO_T0 *versus* TCHOPO_T1



(a) Gráfico Volcano para análise de dispersão, os pontos verdes escuros representam as proteínas com abundância na cepa TCHOPO_T0 e os pontos verdes claros representam as proteínas com maior abundância na cepa TCHOPO_T1. Os pontos em cinza representam proteínas que não mostraram diferença na abundância. Os valores representam a média do total do conteúdo de proteínas de no mínimo duas replicatas para cada isolado. Valores

significantes foram determinados pelo teste *Student t* com FDR 0,05 e $s=0,1$. No gráfico o $-\text{Log}(p) = -\text{Log}(\text{FDR})$: determina o limite de detecção e a diferença $(\text{TP_T1}-\text{TP_T0}) = \log(s)$, utilizando o programa *Perseus* v.2.0.6.0 (TYANOVA et al., 2016); (b) Distribuição das 52 proteínas com diferença de abundância identificadas entre as cepas TCHOPO_T0 e TCHOPO_T1 identificadas na categoria funcional de processo biológico caracterizadas pelo programa *WEGO* de acordo com as assinaturas de GO. Números acima das barras indicam o número de proteínas em cada categoria de GO. O eixo y representa o número de proteínas e o eixo x a distribuição das assinaturas de GO; (c) Das 45 proteínas com maior abundância na cepa TCHOPO_T0, identificou-se 41 genes ortólogos que foram resumidos em termos de GO pelo *GO-Figure!* Semantic space Y e X significa espaço limite de similaridade semântica dos termos de GO, as cores dos círculos são baseadas no valor de p ($p < 0,05$), representado em $\log(p\text{-valor})$. O tamanho dos círculos representa o número de termos de GO. (c1) Os algarismos arábicos representam a distribuição dos sete termos de GO resumidos na categoria de componente celular: 1. Complexo de ribonucleoproteína contendo o C/D tipo RNA, 2. Complexo de miosina, 3. Subunidade pequena proceossoma, 4. Citoplasma, 5. Citoesqueleto de actina, 6. Flagelo, 7. Matrix flagelar. (c2) Os algarismos arábicos representam a distribuição dos 10 principais termos de GO na categoria de função molecular: 1. Ligação de íon, 2. Atividade de farnesil difosfato sintetase, 3. Atividade glutationa deidroascorbato redutase, 4. Atividade Fosfoglicerato quinase, 5. Atividade cistationa beta-sintase, 6. Ligação NADPH, 7. Atividade oligopeotidase, 8. Atividade catalítica, 9. Atividade metalocarboxipeptidase, 10. Ligação adenil ribonucleotideo. (c3). Os algarismos arábicos representam a distribuição dos 10 principais termos de GO na categoria de processo biológico: 1. Metabolismo de colesterol, 2. Síntese de farnesil difosfato, 3. Processo metabólico de organofosforado.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Para estas sete proteínas com abundância significativa na cepa TCHOPO_T1, foram encontrados sete genes ortólogos. Na categoria de componente celular, 2 termos de GO foram enriquecidos contendo proteínas localizadas no flagelo. Na categoria de processo biológico, 18 termos de GOs foram enriquecidos, destacando-se as proteínas envolvidas na regulação negativa da organização de organela, proteínas envolvidas na regulação negativa do ciclo celular mitótico e endocitose. Não foi encontrado proteínas enriquecidas em termo de GO na função molecular.

6.3.7.3 *Análise funcional e enriquecida das proteínas identificadas exclusivamente no cão Tchopo baseada nas categorias de GO*

Das quatro proteínas (ANEXO D) exclusivamente identificadas nas cepas isoladas do cão Tchopo (T0 e T1) tratados e não tratados com miltefosina, três delas a proteína redutase-like ubiquinol-citochrome-c (A4I763) proteína contendo domínio de cinesina (E9AHP6) e a acetil-CoA carboxilase (A4I7A2) foram encontradas exclusivamente no isolado TCHOPO_T0. A proteína putativa Lipase (Class_3) (A0A6L0WQS7) foi identificada exclusivamente nos isolados TCHOPO_T0, TCHOPO_T1 tratado e não tratado com miltefosina. Em nenhuma destas quatro proteínas foi encontrado domínio de transmembrana e nem peptídeo sinal. A localização subcelular foi nuclear, no citoesqueleto, secretadas e na membrana plasmática foi de 25% para cada uma.

6.4 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS B

A análise proteômica de amastigotas dos seis isolados de *L. infantum* identificou 494 proteínas únicas, as quais foram submetidas a análise *in silico* para a detecção de epítopos lineares de células B utilizando a ferramenta *EpiBuilder* (MOREIRA et al., 2022). Foram identificados 173 potenciais candidatas e a análise revelou 356 epítopos, sendo 36 deles epítopos N-glicosilados. Quando se limitou o ponto de cobertura média do epibuilder $\geq 0,7$ e retirou-se os epítopos N-glicosilados, foi encontrado em 62 proteínas 71 epítopos lineares de células B. A seleção de cinco proteínas compartilhadas entre os seis

isolados dos três cães e as espécies de *Leishmania* spp. presentes no banco de dados permitiu identificar seis epítomos lineares. Em destaque a proteína A4HZF7, não caracterizada, que possui localização subcelular de secreção e possui domínio transmembranar.

Utilizando-se o ponto de cobertura de 0,61, buscou-se epítomos exclusivos de *L. infantum* nas 173 proteínas, sendo identificado uma proteína (A4HTB3) e um epítopo (AAETPADDAGQPHAPEKE) compartilhado entre os seis isolados de *L. infantum* e a cepa referência JPCM5 de *L. infantum* (Tabela 13).

Tabela 13 – Distribuição de epítomos lineares de células B identificados no proteoma de amastigotas dos seis isolados de *L. infantum* dos três cães

ID	Gene anotação	Sequência do epítopo/ Tamanho	N- glic ^(a)	Cobertura Média	LS	DTM	PS	SI	Pesquisa direta no Proteoma / Hit em BlastP				
									La	Lb	Ld	Li	Lm
A4HTB3	<i>Splicing factor ptrs1-like protein</i>	AAETPADDAGQPHAPEKE/18	N	0,61	Núcleo	-	-	1/1	-	-	-	1/1	-
A4HTF3	<i>Putative vesicle-associated membrane protein</i>	PPKEYRHKTIEDKDGG/16	N	0,71	Citoplasma	1	-	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
A4HTF3	<i>Putative vesicle-associated membrane protein</i>	EFYNNPQNDK/10	N	0,70	Citoplasma	1	-	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
A4HTP3	<i>Uncharacterized protein</i>	QQYRKPVQDKR/11	N	0,82	Núcleo	-	-	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
A4HZF7	<i>Uncharacterized protein</i>	EVYTPDYWKR/10	N	0,74	Secretada	1	-	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
A4I2A3	<i>Putative cytochrome c oxidase subunit V</i>	RTQYASTMDPRDAD/14	N	0,70	Mitocôndria	-	-	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
P62884	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein</i>	NPDRHSVSDSY/11	N	0,84	Núcleo	-	-	2/2	2/2	1/1	1/1	2/2	2/2

Os epítomos de células B foram preditas utilizando o programa *BepiPred* 3.0. Foram considerados epítomos contendo entre 10 a 30 aminoácidos, sem domínios de N-glicosilação (Asn-Xaa-Ser/Thr), e proteínas contendo um threshold de 0,15 para *BepiPred* 3.0 foram consideradas elegíveis para a análise. ID: número de identificação oriundo do Uniprot. (a) N-glic – N – ausência de sítios de N-Glicosilação. LC: Localização subcelular; DTM: número de domínio transmembrana; PS: Peptídeo sinal; (-):classificação ausente; (+): classificação presente. SI: seis isolados dos três cães, La = *Leishmania amazonensis* cepa MHOM/BR/71973/M2269, Lb: *Leishmania braziliensis* cepa MHOM/BR/75/M2903, Ld: *Leishmania donovani* cepa LdCL, Li: *Leishmania infantum* cepa JPCM5 e Lm: *Leishmania major* cepa Friedlin.
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

7 DISCUSSÃO

A introdução do medicamento oral miltefosina para o tratamento da LVC no Brasil em 2016, representa um importante avanço terapêutico no manejo da doença no cão. Embora a literatura mostre que o tratamento medicamentoso apresenta um impacto positivo com melhora na condição clínica do cão, acompanhado de redução da parasitemia e da carga parasitária, é sabido que o tratamento não elimina o parasito (GONÇALVES et al., 2019; NOGUEIRA et al., 2019). Esse fato é considerado de grande relevância para a seleção de parasitos resistentes e, conseqüentemente, um risco adicional para a população humana. Neste sentido, a investigação e monitoramento de parasitos resistentes continua sendo um grande desafio no contexto das leishmanioses, especialmente na leishmaniose visceral. Com intuito de investigar e entender o perfil biológico e ômico de *L. infantum*, foi realizado a caracterização biológica, o teste de suscetibilidade *in vitro*, a avaliação da transcrição de genes relacionados a suscetibilidade a miltefosina e o proteoma de seis isolados de cães antes e após o tratamento com Milteforan®.

Os cães Jack e Tchopo submetidos ao tratamento com Milteforan® associado ao alopurinol mostraram uma redução de 99,96% e 93,90% na carga parasitária e evolução do estadiamento clínico de estágio III para estágio II (ROSAR, 2022). A combinação do Milteforan® ao alopurinol é o protocolo de tratamento recomendado por inúmeros estudos, uma vez que considera o efeito sinérgico (leishmanicida e leishmaniostático) dos fármacos induzindo uma melhora nos sinais clínicos e redução da carga parasitária em vários tecidos por longos períodos (MANNA et al., 2015; DIAS et al., 2020; IARUSSI et al., 2020). O cão Otto submetido ao tratamento com Milteforan® sem a adição do alopurinol, mostrou uma menor redução da carga parasitária (72,60%) e se manteve no estágio clínico II (ROSAR, 2022). Resultados semelhantes foram reportados no estudo de Nogueira et al. (2019), no qual a monoterapia com Milteforan® proporcionou resultados satisfatórios, reduzindo significativamente a carga parasitária na pele. É importante salientar que devido a atividade prolongada da miltefosina uma maior redução na carga parasitária na pele é observada entre 6 a 12 semanas após o tratamento (NOGUEIRA et al., 2019).

Ayres et al. (2022) demonstraram que o tratamento com Milteforan® e alopurinol, isoladamente ou em associação, promoveu melhora clínica e redução da carga parasitária na pele de cães com LVC em apenas 28 dias de tratamento. No entanto, o prognóstico varia de acordo com o estado clínico do cão e com a resposta imune ao tratamento (DANTAS-TORRES et al., 2012).

A caracterização molecular da espécie de *Leishmania* das cepas isoladas dos cães, Jack, Otto e Tchopo nos tempos T0 e T1 efetuada por meio da técnica de PCR-RFLP utilizando o gene HSP70 (GARCIA et al., 2004), confirmou todos os isolados como *L. infantum*. A identificação desta espécie como a causadora da LVC no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina, está de acordo com estudos prévios realizados na Ilha de Santa Catarina (STEINDEL et al., 2013; ROSAR, 2022), e outros estudos em diferentes regiões do país que confirmam a espécie de *L. infantum* como a causadora de LVC e da leishmaniose visceral humana no Brasil (HOSEIN; BLAKE; SOLANO-GALLEGO, 2017; REIS et al., 2017; BAXARIAS et al., 2019; BRASIL, 2022).

A caracterização biológica mostrou um perfil distinto de crescimento de promastigotas das seis cepas isoladas dos cães em relação a cepa PP75, utilizada como padrão neste estudo (Tabela 4). A cinética de crescimento entre as cepas isoladas do mesmo cão (T0 e T1), a exceção das cepas OTTO_T0 e OTTO_T1, apresentaram diferenças pontuais nos tempos da curva de crescimento (Figura 9b e 9d). Resultados semelhantes foram reportados no estudo de Ferreira-Paes et al. (2020) que utilizaram diferentes cepas de *L. infantum* isoladas a partir de duas espécies de camundongos. Esta variação é esperada, em virtude do elevado polimorfismo genético reportado para o gênero *Leishmania* na literatura.

Estudo de Ferreira et al. (2022) avaliando a curva de crescimento de *L. infantum* isoladas de cães e humano, mostrou que o comportamento de crescimento foi semelhante ao encontrado no presente estudo. É importante ressaltar que a comparação de resultados de curva de crescimento deve ser interpretada com cuidado, visto a grande variabilidade de fatores como: meio de cultura utilizado, inóculo inicial, número de passagens em cultura das cepas, entre outros, que podem interferir de forma significativa tornando a comparação do perfil de crescimento bastante complexa.

Para os ensaios de infecção celular foram utilizados promastigotas do 3º dia e para os ensaios de proteômica foram utilizados promastigotas do 4º dia de cultivo, onde o percentual de promastigotas metacíclicas no 4º dia de cultivo é mais elevado. Embora o processo de metaciclogênese possa ser induzido *in vitro*, há variações substanciais na diferenciação de promastigotas próciclicos em metacíclicos dependendo do isolado ou cepa e do meio de cultura utilizado.

O percentual de formas promastigotas metacíclicas entre as cepas isoladas dos cães foi distinto (Tabela 6). Ferreira-Paes et al. (2020) utilizando diferentes cepas de *L. infantum* mostraram similaridade no comportamento biológico de crescimento, mas diferenças no percentual de metacíclicos entre as cepas. Tano et al. (2022), reportaram diferenças no percentual de promastigotas metacíclicas entre duas cepas de *L. amazonensis*. Estes resultados mostram que a diferenciação *in vitro* é um fenômeno geral e que também é observado em *Trypanosoma cruzi* (SOUZA, 2000).

Estudos de interação *Leishmania* com a célula hospedeira tem sido realizados utilizando diferentes linhagens celulares, bem como macrófagos de origem humana e murina (TÉLLEZ et al., 2017). A célula THP-1 é amplamente empregada para estudos de diferentes aspectos da interação entre *Leishmania* spp. e as células hospedeiras de mamífero (TÉLLEZ et al., 2017; GATTO et al., 2020).

No presente estudo, células THP-1 diferenciadas em macrófagos foram utilizadas para caracterizar o perfil de infectividade, suscetibilidade e o perfil proteômico das seis cepas de *L. infantum* isoladas de cães. Em relação ao perfil de infectividade, as cepas T0 foram mais infectivas que as cepas T1, isoladas do cão Jack e Otto, e a cepa TCHOPO_T1 mais infectiva que a cepa TCHOPO_T0. Além disso, observou-se uma correlação positiva entre o percentual de metaciclogênese e o índice de infecção para todas as cepas isoladas de cães e a cepa padrão. As cepas isoladas dos cães e a cepa PP75 apresentaram um tempo de duplicação maior que 48 horas, sugerindo que a duplicação no interior de macrófagos na espécie de *L. infantum* é lenta e depende da interação do parasito e a ativação da célula hospedeira. Toma et al. (2000) estudando diferentes cepas de *T. cruzi*, observaram diferenças significativas no tempo de duplicação entre as cepas em três linhagens celulares, mostrando que a velocidade de replicação intracelular depende da fonte de tripomastigotas e da linhagem celular utilizada.

A variação na suscetibilidade à miltefosina pode ser explicada por diferenças na taxa de divisão dos parasitos, exposição ao fármaco, alvos bioquímicos, metabolismo do fármaco e conteúdo bioquímico da membrana plasmática. Sendo esta, uma característica inata relacionada a tolerância ao fármaco devido às propriedades bioquímicas e moleculares intrínsecas do parasito. Diferentemente da tolerância ao medicamento, a resistência ao medicamento é uma característica que surge e se espalha após o parasito ser exposto ao medicamento (PEREZ-VICTORIA et al., 2006a; 2006b; COELHO, 2016).

Neste trabalho, os ensaios de atividade leishmanicida da miltefosina frente as formas promastigotas e amastigotas intracelulares demonstraram que o fármaco apresenta maior atividade sobre as formas amastigotas intracelulares do que sobre as formas promastigotas ($SPI > 2$), independentemente do índice de infecção, corroborando com vários estudos independentes descritos na literatura (ESPADA et al., 2021; FERREIRA et al., 2022; GOUVEIA et al., 2022).

No presente trabalho, os valores de CI_{50} da miltefosina obtidos para as cepas isoladas dos cães na forma promastigota e amastigota intracelular, não apresentaram diferença quando comparadas entre as cepas do mesmo cão (T0 e T1). Os valores de CI_{50} encontrados no presente estudo foram semelhantes aos reportados na literatura para isolados de *L. infantum* sem resistência à miltefosina (CASTANYS-MUNÔZ et al., 2008; HENDRICKX et al., 2016; ESPADA et al., 2021; FERREIRA et al., 2022; SABOIA-VAHIA et al., 2022). Kulshrestha (2014) mostrou que a CI_{50} de cepas de *L. donovani* (promastigota e amastigota intracelular), sensíveis a miltefosina foi mais de 10 vezes menor que nas mesmas cepas com resistência induzida. Os resultados obtidos no presente estudo, mostraram que o perfil de suscetibilidade a miltefosina das cepas isoladas de cães, pelo menos em nível de comportamento *in vitro*, não foi alterado pelo tratamento *in vivo* dos cães com Milteforan®.

A avaliação da citotoxicidade da miltefosina frente as células THP-1 no presente estudo, mostrou um valor de CC_{50} de $18,26 \pm 4,92 \mu M$, sugerindo que a atividade leishmanicida da miltefosina observada foi diretamente na forma amastigota intracelular. No estudo de Magoulas et al. (2021) o valor de CC_{50} descrito para células THP-1 foi de $15,9 \pm 1,2 \mu M$. No estudo de Mukherjee et al. (2012) a miltefosina na concentração de $10 \mu M$ reduziu em 60% a viabilidade de células mononucleares

isoladas de sangue humano (PMBC). Estes resultados tomados em conjunto mostram que a seletividade da miltefosina é relativamente baixa.

A maioria dos estudos que descrevem os mecanismos de resistência a fármacos como a miltefosina foram realizados em formas promastigotas (PEREZ-VICTORIA et al., 2006a; 2006b; VINCENT et al., 2013; FERNANDEZ-PRADA et al., 2016). Dessa forma, a determinação da transcrição dos genes associados a suscetibilidade à miltefosina nas cepas isoladas dos três cães foi determinada utilizando também as formas promastigotas. O conhecimento experimental do mecanismo de resistência a miltefosina em *Leishmania* spp. está limitado a defeitos na internalização e translocação defeituosa bem como o aumento do efluxo deste fármaco (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006a,b; TURNER et al., 2015).

Segundo Castanys-Muñoz (2007; 2008) a superexpressão do gene ABCG6 e gene ABCG4 no parasito acarretaria um fenótipo de redução no acúmulo de miltefosina, aumentando duas vezes a CI_{50} de miltefosina no parasito. No presente estudo não foi evidenciado este fato, uma vez que a CI_{50} de parasitos isolados do mesmo cão T0 e T1 (Tabela 7) não apresentaram diferença significativa na CI_{50} tanto na forma amastigota intracelular como na forma promastigota.

Além disso, a transcrição do gene ABCG6 não mostrou diferença quando considerado os pontos de corte ($FC > 3$ e $p\text{valor} > 0,05$) nas seis cepas isoladas de cães, nas diferentes condições experimentais. No entanto, observou-se um aumento significativo na transcrição do gene ABCG4 nas cepas JACK_T1 e OTTO_T0 quando tratados com miltefosina. Contudo, os dados de CI_{50} , tanto de formas promastigotas como de amastigotas intracelulares nestas duas cepas mostram um fenótipo sensível. Dados da literatura mostram que parasitos que superexpressaram os genes ABCG4 ou ABCG6 tiveram um aumento no efluxo da miltefosina, conferindo um fenótipo de resistência ao fármaco em *Leishmania* spp. (COELHO, 2016; PONTE-SUCRE et al., 2017). Neste sentido, o aumento da transcrição do gene ABCG4 observado nestes dois isolados sob pressão do fármaco pode ser interpretada como uma modulação positiva ou uma superexpressão do gene, sem necessariamente uma relação com resistência à miltefosina.

Em relação ao gene da AQP1, apesar de relatos na literatura de que parasitos resistentes à miltefosina apresentarem a expressão do transportador AQP1

aumentada (KULSHRESTHA et al., 2014), no presente trabalho as seis cepas tratadas e não tratadas com miltefosina considerando o ponto de corte, mostraram um perfil transcricional correspondente ao fenótipo de suscetibilidade ao fármaco.

Diferenças na suscetibilidade à miltefosina entre as espécies de *Leishmania* spp. foram associadas à baixa expressão da maquinaria dos genes LiMT e LiRos3 responsáveis pela translocação do fármaco, principalmente associado a mutações pontuais (SÁNCHEZ-CAÑETE et al., 2009; MISHRA; SINGH, 2013). No presente estudo, foi observado um aumento significativo na transcrição do gene LiMT no isolado JACK_T1 após o tratamento com miltefosina. Chama atenção que este isolado apresentou uma CI_{50} tanto em formas promastigotas como amastigotas, compatível com um fenótipo de suscetibilidade. Desta forma, o aumento da transcrição deste gene pode ser um comportamento particular deste isolado. Para o gene LiRos3, todas as cepas tratadas e não tratadas apresentaram um perfil transcricional correspondente ao fenótipo de suscetibilidade à miltefosina.

A análise multivariada (PCA) é uma análise de mérito utilizada para comparação baseada, principalmente, na separação visual das amostras no gráfico. Esta análise projeta os dados nas duas dimensões mais ricas em informações, a qual revela que as réplicas biológicas se agrupem (HOUTVEN et al., 2021). O PCA utilizando o número de transcritos do painel dos genes LiABCG4, LiABCG6, AQP1, LiMT, LiRos3 normalizados pelo gene GAPDH, revelou que 60,62% das variâncias foram explicadas pelo PC1 e PC2, mostrando uma separação em 3 grupos: um grupo com as seis cepas não tratadas, outro com as seis cepas tratadas e um grupo separado da cepa PP75 tratada e não tratada com miltefosina mostrando que esta cepa com e sem tratamento apresentou um perfil de transcrição distinto as cepas isoladas dos cães. Além disso, foi possível observar o agrupamento das cepas tratadas com miltefosina, que diante dos resultados acima discutido, mostra uma modulação na transcrição dos genes o que não se associa a um fenótipo de resistência.

É válido ressaltar que o painel de genes de transcrição com superexpressão de LiABCG4, LiABCG6, AQP1 e diminuição na expressão de LiMT e LiRos3 não está totalmente validado na literatura como um painel para identificação de parasitos resistentes. Além disso, Saboia-Vahia et al. (2022) utilizando proteômica de uma cepa

resistente à miltefosina induzida em laboratório e a cepa sensível, os autores mostraram um decréscimo na concentração da proteína de transporte de ATPase (LiMT) e um aumento na concentração de proteína ABCG4 e de outros transportadores da família ABC, quando comparado com a cepa selvagem. As proteínas relativas aos genes ABCG6, AQP1 e LiRos3 não foram identificadas neste estudo.

É importante salientar que os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam grande plasticidade genômica, o que pode impactar em sua expressão gênica e conferir a eles capacidade de rápida adaptação a condições adversas como estresse ambiental, pressão de fármacos, mudanças em seu habitat natural ou na alternância e adaptação em diferentes hospedeiros (DUMETZ et al., 2017; LACHAUD et al., 2017). Dessa forma, segundo Kulshrestha et al. (2014) a resposta a alta pressão da miltefosina se dá por um comportamento bioquímico perturbado da *Leishmania*, ou seja, a regulação interdependente da expressão gênica para combater a pressão de um fármaco, indicando que o desenvolvimento da resistência do parasito é um fenômeno multifatorial, que ajuda o parasito a sustentar os efeitos letais da miltefosina.

Tendo em vista isso, neste estudo não foi observado aumento ou diminuição significativa e contundente na transcrição de genes envolvidos com o mecanismo de suscetibilidade a miltefosina entre as cepas estudadas, ao contrário do esperado para cepas resistentes à miltefosina. Além disso, há evidências de que a seleção *in vitro* de parasitos na forma amastigota intracelular resistentes a miltefosina é difícil devido ao custo de adaptação para o parasito (FERNANDEZ-PRADDA et al., 2016; HENDRICKX et al., 2016).

Investigações prévias de outros autores, utilizando parasitos das espécies *L. donovani*, *L. major* e *L. infantum* tem revelado a presença de vários pontos de mutação no receptor do tipo P ATPase denominado LiMT e na subunidade β do gene LiRos3 que contribui para um fenótipo de resistência à miltefosina, pois diminuiria a entrada do fármaco na célula (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006; BHANDARI et al., 2012; TURNER et al., 2015; MONDELAERS et al., 2016). A análise das sequências nucleotídicas e aminoacídicas dos três isolados de JACK_T0, OTTO_T0 e TCHOPO_T0 e de outros isolados de cães e um humano do Estado de Santa Catarina, mantidos no Banco de dados do Laboratório de Protozoologia, não

identificou nenhum ponto de mutação nos genes LiMT e LiROS3, bem como nos genes AQP1, ABCG4 e ABCG6 quando comparados ao genoma de referência de *L. infantum* JPMC5.

Embora os isolados JACK_T1, OTTO_T1 e TCHOPO_T1 não tenham sido sequenciados, as características biológicas *in vitro* e o fenótipo de Cl₅₀ da miltefosina tanto de formas promastigotas quanto de formas amastigotas dos isolados sugerem que o tratamento com Milteforan *in vivo* por 28 dias, não foi suficiente para alterar o genótipo e fenótipo em nível de resistência ao fármaco.

A análise das sequências nucleotídicas e aminoacídicas dos genes de suscetibilidade a miltefosina ABCG4, ABCG6, AQP1, LiMT e LiRos3 corroboram os estudos de outros autores com cepas de *L. infantum* provenientes de diferentes hospedeiros (cães e humanos) e de diferentes estados brasileiros que revelaram baixa variabilidade genética (FERREIRA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2017), reforçando que o sistema reprodutivo de *Leishmania* é predominantemente clonal (TIBAYRENC; AYALA et al., 2021).

O genoma de *L. infantum* da cepa JPCM5 é de 32,12 Mb distribuídos em 36 cromossomos e o proteoma predito para esta espécie é de aproximadamente 8.500 proteínas (PEACOCK et al., 2007; PRAVA; PAN, 2022; SABOIA-VAHIA et al., 2022). As formas amastigotas intracelulares das seis cepas isoladas de cães tratadas e não tratadas com miltefosina *in vitro* foram comparadas em termos de abundância de proteínas, conforme demonstrado pela análise do proteoma. Do total de 4.729 proteínas identificadas e validadas nas células THP1 infectadas com os seis isolados tratados e não tratados, 494 foram identificadas e validadas como proteínas únicas de *L. infantum*, o que representa 5,8% das proteínas preditas no genoma da cepa de referência JPCM5 (PEACOCK et al., 2007; GONZÁLEZ-DE LA FUENTE et al., 2017), considerando uma proteína por gene.

A identificação de um baixo percentual de proteínas únicas de *L. infantum*, neste trabalho, pode ser devida, em parte, ao fato de o estudo do proteoma de formas amastigotas intracelulares oriundos de células humanas infectadas apresentar desafios técnicos devido à interferência de proteínas do hospedeiro ao longo das etapas de extração e purificação impactando na capacidade de identificar com acurácia um número maior de proteínas do parasito (REZENDE et al., 2017).

No presente estudo, a técnica de citometria de fluxo e qPCR foi utilizada para estimar a taxa de infecção e a carga parasitária no experimento para a obtenção do proteoma das seis cepas isoladas de cães (Tabela 9). Observou-se uma correlação positiva ($r=0,7705$; $p=0,0034$) entre o percentual de infecção celular e o número de proteínas de *L. infantum* identificadas em cada cepa, nas diferentes condições experimentais. Mesmo com redução ou permanência na quantidade de DNA do parasito nas amostras tratadas, não houve alteração significativa na taxa de infecção, na concentração de proteína total e no conteúdo de proteína total, apesar de verificar variações no número de proteínas identificadas para cada cepa.

No estudo de Saboia-Vahia et al. (2022), os autores observaram que cepas com fenótipo de resistência a miltefosina apresentaram conteúdo de proteína total por célula menor que a cepa sensível. No estudo de Prajapati et al. (2013), os autores mostraram que a falha terapêutica não necessariamente está associada a um mecanismo de resistência do parasito à miltefosina.

A falha terapêutica da miltefosina pode estar associada a características intrínsecas do hospedeiro, como baixa exposição do parasito ao fármaco (farmacocinética), alta carga parasitária, aspectos imunológicos e outros fatores ainda não identificados que possam estar envolvidos na ineficácia do tratamento (COELHO, 2016). No presente estudo, a avaliação das cepas de *L. infantum* isoladas de cães antes e após um ciclo de tratamento com miltefosina *in vivo*, não mostrou diferenças nos diversos parâmetros avaliados entre as cepas isoladas dos cães. Estes resultados sugerem que a falha terapêutica observada nos cães não pode ser explicada pelo fenótipo e genótipo do parasito.

A análise de PCA dos componentes PC1 e PC2 explicaram 76,42% das variâncias. Com esta análise foi possível mostrar um agrupamento mais compacto e isolado das cepas isoladas do cão Otto, devido, provavelmente, ao fato que nestas cepas foi identificado um maior número de proteínas.

Uma segunda análise de PCA das proteínas identificadas das cepas (T0 e T1) isoladas de cada cão, tratadas e não tratadas com miltefosina, mostrou variações na distribuição do conteúdo total de proteína. No entanto, esta variação não foi observada em nível de abundância, uma vez que as análises diferenciais quantitativas de proteínas entre as cepas isoladas do mesmo cão nas diferentes condições

experimentais foram pontuais. O nível de variabilidade entre cepas T0 e T1, não apresentaram diferenças significativas relacionadas ao tratamento com miltefosina. Além disso, aproximadamente 70% das proteínas foram identificadas e compartilhadas entre as cepas isoladas de cada cão nas diferentes condições experimentais. Dessa forma, é provável que esta variabilidade na distribuição de proteína observada nestas análises de PCA (Figura 21a, 23a e 25a), seja uma disparidade numérica de proteínas, sugerindo um viés experimental.

As formas amastigotas vivem e se replicam dentro do vacúolo parasitóforo (PV), onde há uma drástica mudança nas condições ambientais como alterações no pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes (GUPTA; GOYAL; RASTOGI, 2001). O fagolisossoma ocupado por *Leishmania* spp. é altamente dinâmico e recebe uma ampla gama de macromoléculas do hospedeiro por meio da fusão com vesículas das vias fagocítica, endocítica e autofágica, bem como do retículo endoplasmático (MCCONVILL et al., 2007; NADERER; MCCONVILLE, 2011). É consenso que a grande maioria dos genes em *Leishmania* spp. são expressos constitutivamente com a expressão de um limitado número de genes estágio-específicos (COHEN-FREUE et al., 2007).

No presente estudo, a distribuição do número de proteínas dos isolados de cada cão nas diferentes condições experimentais, mostrou 364 proteínas para as cepas isoladas do cão Jack, 488 para as cepas isoladas do cão Otto e 391 proteínas para as cepas isoladas do cão Tchopo. Identificou-se um total de 494 proteínas como únicas entre as cepas isoladas dos três cães e 225 proteínas únicas foram compartilhadas entre as diferentes cepas. Além disso, 70 proteínas exclusivas, foram identificadas nas cepas isoladas do cão Otto, uma para as cepas isoladas do cão Jack e quatro para as cepas isoladas do cão Tchopo.

A caracterização das 494 proteínas únicas do proteoma total mostrou que 99% delas tiveram sua função identificada e para 1% não foi possível obter nenhuma anotação de função nos bancos de dados consultados. As 494 proteínas estão localizadas principalmente no citoplasma 44,24%, mitocôndria 19,08% e núcleo 16,40%. Destas, 2,02% possuem peptídeo sinal, 7,08% possuem pelo menos um domínio transmembrana e no caso da Leishmanolisina (A0A6L0WJL3) o domínio transmembrana e âncora de GPI. O reconhecimento de proteínas de membrana

plasmática, na maioria dos estudos em *Leishmania* spp. consideram a presença de domínio transmembrana e/ou âncora de GPI (YAO et al., 2010; BROTHERTON et al., 2012; LYNN; MARR; MCMASTER, 2013; KUMAR et al., 2015).

Observou-se cinco proteínas não caracterizadas e sem peptídeo sinal e domínio transmembrana no presente estudo. Proteínas de função desconhecida em formas amastigotas intracelulares, podem apresentar relevância para novos processos biológicos, potencial alvo terapêutico e diagnóstico e novos alvos vacinais contra as leishmanioses (ASHRAFMANSOURI; AMIRI-DASHATAN; AHMADI, 2022).

A análise funcional em termos de GO de 225 proteínas únicas e compartilhadas entre as seis cepas isoladas dos cães caracterizaram-se em componente celular (30,12%), função molecular (38,53%) e processos biológicos (31,35%).

A análise do componente celular revelou que as proteínas se localizam nas organelas e no ambiente intracelular e com a localização enriquecida no glicosoma. Dados da literatura mostram que o glicosoma compartimentaliza as enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos em *Leishmania* e em outros Kinetoplastida (MICHELS et al., 2006; CULL et al., 2014). O metabolismo de carboidrato envolve 32 enzimas, cujas rotas da glicólise/gliconeogênese se dividem no glicosomo e no citoplasma até a formação do piruvato. A glicólise está compartimentada no glicosomo do passo da glicose até o 3-fosfoglicerato, e no citosol até a formação do piruvato (SANCHIZ et al., 2020). No presente trabalho, identificou-se dentre as 225 proteínas compartilhadas, as proteínas da via glicolítica/gliconeogênica glicosomais e citosólicas (ANEXO D).

Na categoria de função molecular, os termos de GO mais relevantes das 225 proteínas únicas estavam envoltos na função de ligação e atividade catalítica. A análise enriquecida revelou o envolvimento de proteínas com a ligação de nucleotídeo e atividade carboxipeptidase. Estudo de Pissarra et al. (2022) mostrou que a atividade catalítica, a função de ligação, a atividade antioxidante e a atividade reguladora da função molecular foram as mais relevantes, as quais exercem papel de extrema importância para a sobrevivência do parasito na célula hospedeira. Magalhães et al. (2014) mostraram que proteínas da família das carboxipeptidases estão associadas a fatores de virulência em *T. cruzi* e como enzimas ativas no catabolismo de peptídeos,

favorecendo o crescimento e multiplicação do parasito. Fialho-Junior et al. (2021) mostraram que os termos de GO representantes na função molecular nas formas amastigotas da cepa mais virulenta de *L. infantum* apresentaram expressão aumentada nas proteínas classificadas na atividade catalítica (15% das proteínas) e na ligação de nucleotídeos (15% das proteínas).

Na categoria de processos biológicos, a análise funcional revelou proteínas envolvidas em processos metabólicos e celular. Já a análise enriquecida de GO identificou proteínas envolvidas com o metabolismo de carboidrato, processo metabólico de nucleotídeos e processo catabólico. Dados da literatura mostram que alterações nos processos metabólicos (RAINEY et al., 1991) e de transporte (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994) são cruciais para a adaptação do parasito ao ambiente ácido e privado de nutrientes no vacúolo parasitóforo (BIYANI; MADHUBALA, 2012).

O elevado número de proteínas envolvidas nos processos metabólicos e celulares, regulação e resposta a estímulos sugerem um papel relevante destas proteínas na modulação da resposta do hospedeiro à infecção (PISSARRA et al., 2022). Fialho-Junior et al. (2021) mostraram que amastigotas da cepa virulenta de *L. infantum* tiveram aumentada a abundância de proteínas envolvidas nos processos metabólicos (16% das proteínas) e em relação a glicólise 20% das proteínas aumentaram e 20% diminuíram sua abundância.

Os resultados do presente estudo corroboram dados da literatura que mostram que as formas amastigotas intracelulares produzem energia por meio da oxidação de ácidos graxos, metabolismo de aminoácidos, glicólise e gliconeogênese (ROSENZWEIG et al., 2008a; 2008b; PAAPE; AEBISCHER, 2011; ASHRAFMANSOURI; AMIRI-DASHATAN; AHMADI, 2022).

Em resumo, dentre as 225 proteínas compartilhadas entre as seis cepas isoladas dos cães tratadas e não tratadas com miltefosina *in vitro* foram identificadas as proteínas envolvidas na alteração dos processos metabólicos em amastigotas como presença de proteínas envolvidas na glicólise/gliconeogênese para aquisição de nutrientes, proteínas envolvidas na produção de ATP, enzimas envolvidas na síntese de proteica, proteínas com função transportadora que ajudam a manter um gradiente de concentração de prótons através da membrana (ANEXO D). O

enriquecimento funcional das proteínas está envolvido com o metabolismo de carboidrato e no processo metabólico de nucleotídeos relacionado a aquisição de nutrientes das células hospedeiras (ASHRAFMANSOURI et al., 2020; ASHRAFMANSOURI; AMIRI-DASHATAN; AHMADI, 2022; PACAKOVA et al., 2022; TANO et al., 2022).

Como terceiro parâmetro, considerou-se a análise das proteínas diferencialmente abundantes entre as cepas isoladas do cão Jack e Tchopo. A análise de dispersão diferencial mostrou que 59 proteínas apresentaram significativa diferença na abundância entre as cepas JACK_T0 e JACK_T1. Destas 27 proteínas tiveram a abundância aumentada no isolado JACK_T0 e 32 proteínas no isolado JACK_T1. A distribuição das proteínas em termos de GO nas categorias funcionais foi similar entre ambas as cepas para o processo biológico, 34,04% e 31,43% para as cepas JACK_T0 e JACK_T1, respectivamente. Ambas apresentaram o processo metabólico e processo celular como principais categorias (Figura 22b).

O enriquecimento funcional das 27 proteínas das cepas JACK_T0 destacou proteínas com a localização glicossomal e proteínas envolvidas no processo glicolítico, sem apresentar proteínas enriquecidas na função molecular. As proteínas envolvidas na glicólise, gliceraldeído-3-dehidrogenase glicossomal (A4I5X6) e a glicose-6-fosfato isomerase (Q3C165), a enzima envolvida com a gliconeogênese, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (A4I2Y7), e a proteína transportadora de glicose 2 (A0A6L0Y406), a qual está integrada na membrana e sua função molecular é o transporte de carboidrato, tiveram aumento significativo na abundância cepa (ANEXO D).

No estudo de Biyani e Madhubala (2012) os autores relataram um aumento na abundância de um transportador de glicose (LinJ33_V3.0310), em amastigotas quando comparado com promastigotas de *L. donovani*.

O glicossomo, em *Leishmania*, é uma organela que contém enzimas responsáveis pela glicólise/gliconeogênese (SANCHIZ et al., 2022). A glicólise é criticamente modulada dentro de amastigotas intracelulares, e estas resgatam nutrientes de baixo peso molecular (hexoses, aminoácidos, poliaminas, purinas e vitaminas) por meio de seus transportadores de membrana enquanto se multiplicam dentro do vacúolo parasitóforo. Macromoléculas maiores, como proteínas,

carboidratos, DNA e RNA, são absorvidas pelos parasitos diretamente por endocitose (MCCONVILLE et al., 2007).

Em relação ao enriquecimento funcional das 32 proteínas com significativa abundância aumentada da cepa JACK_T1, as proteínas enriquecidas no componente celular estavam localizadas no citoplasma. Não foram encontradas proteínas com termos de GO enriquecido nas categorias do processo biológico e função molecular.

A análise de abundância entre as cepas TCHOPO_T0 e TCHOPO_T1 mostrou diferença na abundância em 52 proteínas. Quarenta e cinco proteínas com abundância significativamente aumentada na cepa TCHOPO_T0 e 7 proteínas com abundância aumentada na cepa TCHOPO_T1. A distribuição das proteínas na categoria funcional de processo biológico foi de 35,71% e 45,45% para TCHOPO_T0 e TCHOPO_T1, respectivamente. Ambas cepas tiveram o processo metabólico e processo celular como principais representantes e curiosamente o processo de regulação biológica (regulação negativa) do processo biológico destacou-se nas proteínas significativamente abundantes na cepa TCHOPO_T1. O estudo de Ashrafmansouri, Amiri-Dashatan e Ahmadi (2022) mostrou que a regulação negativa dos processos anabólicos envolveu proteínas, como a atividade translacional e a via glicolítica e a regulação positiva das funções catabólicas, incluindo o metabolismo de lipídios e aminoácidos no estágio amastigota.

O enriquecimento funcional das 45 proteínas com abundância aumentada na cepa TCHOPO_T0 demonstrou proteínas localizadas no flagelo e na matriz flagelar como categoria funcional do componente celular. Na categoria de processo biológico a biossíntese de farnesil difosfato e processo biológico de organofosforado foi enriquecida, tendo aumento significativo na abundância da enzima farnesil pirofosfato sintase (E9AH04). Mukherjee, Basu e Zhang (2019), mostraram que a enzima ortóloga a E9AH04 em *L. major*, catalisa a formação de farnesil pirofosfato, um intermediário chave para a biossíntese de todos os isoprenóides de importância, como o ergosterol, tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota intracelular.

Outra categoria dentro do processo biológico que foi enriquecida foi o metabolismo de colesterol. Importante salientar que o gênero *Leishmania* é incapaz de sintetizar colesterol, em vez disso, a *Leishmania* sintetiza esteróis com 24 carbonos (C24) alquilados (esteróis à base de ergostano) (GOAD; HOLZ JR; BEACH, 1984).

Estudos tem mostrado que as formas amastigotas possuem a capacidade de acumular o colesterol derivado do hospedeiro ao mesmo tempo que a concentração de ergosterol endógena é diminuída (XU et al., 2014). Estudos transcriptômicos mostraram que a infecção por *Leishmania* modulou a expressão de genes associados à biossíntese, captação e efluxo de colesterol em células hospedeiras (RABHI et al., 2012). Segundo o estudo de Semini et al. (2017) a infecção por *Leishmania* está associada a uma maior retenção de colesterol exógeno e ácidos graxos ligados ao LDL no vacúolo parasitóforo. Isso se correlaciona com uma concentração de colesterol celular livre sequestrado ao redor do parasito (halo de colesterol). Yao e Wilson (2016) mostraram que formas promastigotas de cepas virulenta e não virulenta de *L. infantum* foram capazes de absorver colesterol do ambiente extracelular.

Na cepa TCHOPO_T1 identificaram-se sete proteínas com abundância aumentada, dentre elas a lipase-putativa (A0A6L0WQS7), a enzima putativa serine/treonina-protein quinase (A4I4X0) e ATPase subunidade alfa (A4HSH2). No estudo de Kulshrestha et al. (2014) com *L. donovani*, os autores demonstraram que a maior transcrição destas proteínas ortólogas A0A6L0WQS7, A4I4X0 e A4HSH2 estão associadas ao perfil de cepas resistentes a miltefosina.

No presente trabalho, mesmo que a cepa TCHOPO_T1 tenha mostrado diferença no percentual de promastigotas metacíclicas em cultura e, conseqüentemente, maior índice de infecção celular quando comparado as outras cepas isoladas de cães e a cepa PP75, o fenótipo tanto em promastigotas e em amastigotas mostrou-se de sensibilidade a miltefosina, resultado de acordo com o encontrado na literatura (CASTANYS-MUNÔZ et al., 2008; HENDRICKX et al., 2016; ESPADA et al., 2021; FERREIRA et al., 2022; SABOIA-VAHIA et al., 2022).

Dessa forma, mesmo com a metaciclogênese diferenciada na cepa TCHOPO_T1, não foi possível correlacionar este comportamento com uma maior resistência frente a miltefosina. Turner et al. (2015), mostraram que a metaciclogênese aumentada não é um marcador isolado para resistência, devendo este estar associado a outros fatores. Além disso, nesta cepa não foi observado aumento significativo na abundância da proteína HSP70 mitocondrial como observado por Vacchina et al. (2016) em isolados de *L. donovani* resistentes à miltefosina. Também não foi observado um aumento significativo na abundância de proteínas associadas à

homeostase redox, resposta ao estresse, proteção contra apoptose e translocação de drogas como reportado por Carnielli et al. (2014) em isolados de *L. infantum* resistentes à miltefosina.

Curiosamente a enzima dimetilargininase (E9AG92), secretada pela *L. infantum*, foi encontrada em maior abundância nas cepas JACK_T0 e TCHOPO_T1. Esta enzima, foi recentemente estudada em soro de cães com LV e pode ser incorporada como um biomarcador auxiliar a creatinina no monitoramento do comprometimento funcional renal em cães e na detecção precoce de nefropatia associada a LVC (GIAPITZOGLOU et al., 2020). Além disso, a proteína não caracterizada (A4I5R1), foi observada com abundância aumentada nestas cepas (JACK_T0 e TCHOPO_T1). De acordo com Ashrafmansouri, Amiri-Dashatan e Ahmadi (2022), proteínas não caracterizadas necessitam de mais estudos para identificar sua função e os processos biológicos aos quais estão envolvidas, uma vez que o conhecimento destas funções pode explicar diferenças biológicas e comportamentais neste parasito.

Vale destacar que os resultados das análises das proteínas identificadas com abundância diferencial entre as cepas e desafiadas com a CI_{50} da miltefosina, não demonstraram alteração em nenhuma proteína associada com o mecanismo de ação da miltefosina (PÉREZ-VICTORIA; CASTANYS; GAMARRO, 2003; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; PÉREZ-VICTORIA et al., 2006a,b; RAKOTOMANGA et al., 2007; BIBIS et al., 2014; ARMITAGE et al., 2018; BASMACIYAN; CASANOVA, 2019; CAPELA; MOREIRA; LOPES, 2019; PARREIRA DE AQUINO et al., 2021), ou proteínas associadas aos mecanismos de resistência à miltefosina, como as proteínas envolvidas aos defeitos na internalização – translocação defeituosa da miltefosina bem como no aumento do efluxo deste fármaco (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006a,b; BHANDARI et al., 2012; KULSHRESTHA et al., 2014; TURNER et al., 2015; COELHO, 2016; MONDELAERS et al., 2016; PONTE-SUCRE et al., 2017).

O quarto critério foi a análise funcional das proteínas únicas e exclusivas identificadas entre os isolados não tratados e tratados com miltefosina. A proteína β 1,3 galactosiltransferase_5 (A0A6L0XL35), foi exclusivamente identificada nas cepas JACK_T0 tratada e não tratada com miltefosina, não sendo observado enriquecimento funcional em nenhuma categoria. Segundo Sizova et al. (2011), a função desta

proteína é a atividade de glicosiltransferase que adiciona galactose ligada a posição (β 1–3) as ramificações das cadeias laterais de lipofosfoglicano em *Leishmania*. Além disso, a enzima β -1,3-galactosiltransferase-5/6 realiza a galactosilação de proteofosfoglicano e lipofosfoglicano em condições de alta temperatura e baixo pH, no ambiente do vacúolo parasitóforo (ALCOLEA et al., 2010). Guerfali et al. (2008) observaram aumento da transcrição gênica desta família de proteínas em macrófagos humanos infectados com *L. major*.

Foram identificadas 70 proteínas exclusivas entre as cepas isoladas do cão Otto. É importante salientar que as cepas deste cão também tiveram um maior número de proteínas identificadas, podendo este resultado estar associado a uma maior taxa de infecção, a qual não se mostrou significativa, mas permitiu uma correlação positiva ou provavelmente devido a um viés experimental. A análise destas cepas tratadas e não tratadas com miltefosina em relação a abundância diferencial, não mostrou diferença significativa de abundância entre nenhuma das proteínas identificadas. A análise de 11 proteínas compartilhadas entre as cepas T0 e T1 tratadas e não tratadas mostrou que nenhuma delas apresentou função enriquecida em nenhuma das categorias.

Das quatro proteínas exclusivamente identificadas nos isolados do cão Tchopo, três delas a proteína redutase-like ubiquinol-citochrome-c (A4I763) proteína contendo domínio de cinesina (E9AHP6) e acetil-CoA carboxilase (A4I7A2) foram encontradas exclusivamente no isolado TCHOPO_T0. A proteína putativa Lipase (Class_3) (A0A6L0WQS7) foi identificada exclusivamente nos isolados TCHOPO_T0, TCHOPO_T1 tratado e não tratado. Ademais, esta proteína se destacou dentre as 7 proteínas com maior abundância significativa na cepa TCHOPO_T1. Quando analisadas dentro do mesmo conjunto, estas proteínas caracterizaram-se no processo biológico de metabolismo de lipídeos com a função molecular principal a atividade da acetil-CoA carboxilase.

As lipases secretadas por *Leishmania* podem ter importante função na obtenção de lipídeos, uma vez que estes parasitos são captadores facultativos de lipídeos, obtendo estas macromoléculas de seu hospedeiro. Logo, esta enzima secretada pelo parasito, quebra ácido graxos do hospedeiro mamífero para uso na síntese de lipídios complexos ou como substratos para a beta oxidação e metabolismo

energético (SHAKARIAN et al., 2010). Mesmo que a *Leishmania* prefira a glicose com fonte de carbono, a oxidação de ácidos graxos pode servir como principal fonte de energia em amastigotas uma vez que os lipídeos estão disponíveis no vacúolo parasitóforo dos sistemas de endocitose e autofagia (SEMINI et al., 2020).

As predições de epítomos lineares de células B estão baseados na suposição de que peptídeos sintéticos, correspondentes a segmentos lineares em proteínas, podem induzir a produção de anticorpos reagentes a estes peptídeos e, podem desencadear uma reação cruzada com o antígeno presente na proteína nativa, acarretando a neutralização do patógeno que contém o antígeno e, consequentemente, reduzindo sua infectividade (HAGER-BRAUN; TOMER, 2005).

Os métodos computacionais para predição de epítomos vêm sendo aplicados na busca por peptídeos para o desenvolvimento de novos alvos para imunodiagnóstico, vacinas e na terapêutica de LV. Estudos de predição de epítomos lineares de célula B de proteínas de *L. infantum* identificadas *in silico* tem contribuído com a identificação de novos antígenos com potencial aplicação no diagnóstico e controle da LV (FARIA et al., 2011; COSTA et al., 2011; ASSIS et al., 2014). O EpiBuilder é uma ferramenta capaz de montar epítomos de células B a partir de dados gerados pelo BepiPred-2.0 e auxilia o pesquisador em escala proteômica (MOREIRA, et al., 2022).

No presente estudo, seis epítomos lineares de células B identificados no proteoma de amastigotas intracelulares e compartilhados entre os seis isolados e as cinco espécies de *Leishmania* do banco de dados mostraram um ponto de cobertura $\geq 0,7$, o que validaria estes epítomos como promissores alvos vacinais ou de imunodiagnóstico, principalmente a proteína A4HZF7, não caracterizada, que é secretada e possui domínio transmembranar. Além disso, em uma proteína (Splicing fator ptsr1-like), de localização subcelular no núcleo, foi identificado um epítomo linear único presente nos seis isolados estudados e compartilhado com cepa de referência JPCM5 de *L. infantum*, com um ponto de cobertura de 0,61.

As sequências de epítomos encontrados neste estudo, podem ser usadas como “molde” para produção de peptídeos sintéticos que possam sofrer mudanças conformacionais produzindo um antígeno adequado que imita a estrutura nativa da região antigênica da proteína, capaz de se ligar e/ou estimular a produção de

anticorpos específicos. Apesar das limitações, a identificação de epítomos lineares tem mostrado resultados promissores na identificação de antígenos e alérgenos vacinais, bem como para o imunodiagnóstico da leishmaniose (ASSIS et al., 2014). Estudos de bioinformática demonstraram que vários epítomos preditos *in silico* submetidos à síntese de peptídeos, isolados ou na forma quimérica e testados em imunoensaio apresentaram resultados satisfatórios, demonstrando a potencial eficiência dos métodos de predição, sua utilidade na identificação de novos antígenos, sobretudo de *L. infantum*, e sua aplicação no desenvolvimento de testes diagnósticos mais precisos e desenvolvimento de vacinas (FARIA et al., 2011; VALE et al., 2021).

8 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que:

- O perfil de crescimento das cepas isoladas no T0 e T1, apesar de apresentar diferenças pontuais, foi similar entre as cepas estudadas e distinto da cepa de referência;
- A média do IF nos tempos analisados foi significativamente maior na cepa TCHOPO_T1 seguido da OTTO_T0 e JACK_T0 sugerindo ausência de correlação com o tratamento *in vivo*;
- A cepa TCHOPO_T1 apresentou percentual mais elevado de metaciclogênese e maior taxa de infecção celular;
- Os ensaios *in vitro* com miltefosina nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares revelaram um fenótipo de suscetibilidade e a atividade leishmanicida do fármaco mostrou-se mais elevada contra as formas amastigotas intracelulares;
- A transcrição de genes relacionadas a suscetibilidade à miltefosina, mostrou uma modulação nas formas promastigotas, sem apresentar perfil transcricional de resistência;
- Nenhuma das cepas T0 mostrou perfil gênico de resistência a miltefosina em nível de sequência nucleotídicas e aminoacídicas dos genes LiMT e LiRos3;

- A análise do proteoma total de formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* das seis cepas, submetidas a diferentes condições experimentais identificou 99% da função das proteínas únicas identificadas;
- A análise comparativa do PCA do proteoma global das cepas nas diferentes condições experimentais agrupou separadamente as cepas isoladas do cão Jack, Otto e Tchopo, mesmo que aproximadamente 70% das proteínas foram compartilhadas;
- Dentre as 225 proteínas compartilhadas entre as seis cepas nas diferentes condições experimentais se destacam as proteínas envolvidas nos processos metabólicos de carboidrato, nucleotídeos e catabólico;
- A avaliação de proteínas compartilhadas com abundância diferencial significativa entre as cepas, não demonstrou alteração em nenhuma proteína associada, até o momento conhecido, com o mecanismo de ação ou de resistência à miltefosina;
- Cinco proteínas anotadas como não caracterizadas sem sua função ou termos de GO identificados, podem ser relevantes para melhor compreensão da diversidade dos processos biológicos e celulares em *Leishmania* spp.;
- As sequências de epítomos lineares de célula B de proteínas de *L. infantum* identificadas *in silico* no presente estudo tem potencial para síntese de peptídeos sintéticos para fins de diagnóstico e alvos vacinais.

Em resumo, as diferenças biológicas pontuais intrínsecas entre as cepas T0 e T1 isoladas de cada cão, a variabilidade no comportamento frente ao tratamento com a miltefosina, o nível de transcrição dos genes associados a suscetibilidade à miltefosina e as diferenças pontuais de abundância entre proteínas das cepas isoladas do cão Jack e Tchopo, pode-se afirmar que o tratamento *in vivo* com Milteforan por 28 dias não acarretou pressão seletiva suficiente para selecionar populações de parasitos resistentes.

9 PERSPECTIVAS

- Efetuar a análise aprofundada das cinco proteínas não caracterizadas e sem função identificadas no presente estudo;

- Efetuar a análise do proteoma agrupando as cepas dos três cães nos tempos T0 e T1 com e sem tratamento com intuito de identificar proteínas importantes relacionadas ao transporte ou detoxicação da miltefosina;
- Efetuar análises computacionais para predição de epítomos, incluindo organismos filogeneticamente próximos como *Trypanosoma* sp;
- Analisar o proteoma das células THP-1 infectadas com as seis cepas isoladas dos cães, tratadas e não tratadas com miltefosina que podem ser úteis, para a compreensão do papel da célula hospedeira no curso da infecção e compreender a função da célula hospedeira no metabolismo da miltefosina.

REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1-40, 2016.
- ALCOLEA, P. J. et al. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 31, p. 1-24, 2010.
- ARMENTEROS, J. J. A. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v.37, n. 4, p. 420-423, 2019.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.
- ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018.
- ARMITAGE, E. G. et al. Complex interplay between sphingolipid and sterol metabolism revealed by perturbations to the *Leishmania* metabolome caused by miltefosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 1-12, 2018.
- ARONSON, N. et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 63, n. 12, p. 1-63, 2016.
- ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: Tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v.25, n.1, p. 25-29, 2000.

- ASHRAFMANSOURI, M.; AMIRI-DASHATAN, N.; AHMADI, N. Identification of protein profile in metacyclic and amastigote-like stages of *Leishmania tropica*: a proteomic approach. **AMB Express**, v.12, n.142, p. 1-13, 2022.
- ASHRAFMANSOURI, M. et al. Quantitative proteomic analysis to determine differentially expressed proteins in axenic amastigotes of *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. **IUBMB Life**, v. 72, n. 8, p. 1715-1724, 2020.
- ASLAM, B. et al. Proteomics: Technologies and their applications. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 2, p. 182-196, 2017.
- ASSIS, L. M. et al. B-cell epitopes of antigenic proteins in *Leishmania infantum*: an *in silico* analysis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 7, p. 313-23, 2014.
- AYRES, E. D. C. B. S. et al. Clinical and parasitological impact of short-term treatment using miltefosine and allopurinol monotherapy or combination therapy in canine visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, n. 3, p. 1-10, 2022.
- BASMACIYAN, L.; CASANOVA, M. Cell death in *Leishmania*. **Parasite**, v. 26. n. 71, p. 1-13, 2019.
- BAXARIAS, M. et al. Immunotherapy in clinical canine leishmaniasis: a comparative update. **Research in Veterinary Science**, v. 125, p. 218-226, 2019.
- BENEKE, T. et al. Genetic dissection of a *Leishmania flagellar* proteome demonstrates requirement for directional motility in sand fly infections. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 6, p. 1-31, 2019.
- BHANDARI, V. et al. Drug susceptibility in *Leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. 1-6, 2012.
- BIBIS, S. S. et al. Characterization of *Leishmania major* phosphatidylethanolamine methyltransferases LmjPEM1 and LmjPEM2 and their inhibition by choline analogs. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 196, n. 2, p. 90-99, 2014.
- BIYANI, N.; MADHUBALA, R. Quantitative proteomic profiling of the promastigotes and the intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* isolates identifies novel proteins having a role in *Leishmania* differentiation and intracellular survival. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 12, p. 1342-1350, 2012.
- BOELAERT, M.; SUNDAR, S. **Leishmaniasis**. Manson's Tropical Infectious Diseases. 23. ed. Oxford: Saunders, 2014.
- BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Leishmaniose visceral**. Guia de Bolso. Brasília: CFMV, v. 1, p. 1-194, 2020. Disponível em:

<https://www.cfmv.gov.br/guia-de-bolso-sobre-leishmaniose-visceral/comunicacao/publicacoes/2020/11/02/#1>. Acesso em: 02 nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais**. Brasília, p. 1-120, 2016. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_prevencao_controle_zoonoses.pdf. Acesso em: 23 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, p. 1-122, 2014. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmanios_e_visceral_1edicao.pdf. Acesso em: 21 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral**. Brasília, 1-18, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/atualizacao-21-10-2022/lv-graficos-e-mapas.pdf>. Acesso em: 21 out. 2022.

BRASILEISH. Grupo de Estudos em Leishmaniose Animal. **Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina**. Belo Horizonte, 2018. Disponível em: <https://www.brasileish.com.br/diretrizes.htm>. Acesso em: 22 out. 2022.

BRETAGNE, S. et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clinical Diagnostics Laboratory Immunology**, v. 8, n. 4, p. 828-831, 2001.

BROTHERTON, M. C. et al. Analysis of membrane-enriched and high molecular weight proteins in *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 8, p. 3974-3985, 2012.

BROTHERTON, M. C. et al. Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 126-132, 2014.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

CAMACHO, C. et al. BLAST+: Architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v.10, n. 421, p. 1-9, 2009.

CAMILLO-ANDRADE, A. C. et al. Proteomics reveals that quinoa bioester promotes replenishing effects in epidermal tissue. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p.1-11, 2020.
CAMPOS, P. D. Image: Santa Catarina MesoMicroMunicip.svg. Florianópolis, 2006. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Regi%C3%A3o_Metropolitana_de_Florian%C3%B3polis#/media/Ficheiro:SantaCatarina_Metro_Florianopolis.svg. Acesso em: 21 ago. 2022

CAPELA, R.; MOREIRA, R.; LOPES, F. An overview of drug resistance in protozoal diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 1-30, 2019.

CAPELLI-PEIXOTO, J. et al. Proteomics and Leishmaniasis: Potential clinical applications. **Proteomics – Clinical Applications**, v. 13, n. 6, p. 1-16, 2019.

CARNIELLI, J. B. T. et al. 3'Nucleotidase/nuclease is required for *Leishmania infantum* clinical isolate susceptibility to miltefosine. **EBio Medicine**, v.86, p.1-18, 2022.

CARNIELLI, J. B. T. et al. A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. **EBio Medicine**, v. 36, p. 83-91, 2018.

CARNIELLI, J. B. T. et al. Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant *Leishmania infantum* chagasi isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes. **Journal of Proteomics**, v. 108, p. 198-208, 2014.

CARVALHO, M. R.; DIAS, Á. F. L. R.; ALMEIDA, A. et al. Canine visceral leishmaniasis: perception, prevalence, and spatial distribution in municipality of Nossa Senhora do Livramento, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.29, n. 2, p. 1-11, 2020.

CARVALHO, R. V. H. et al. *Leishmania* RNA virus exacerbates Leishmaniasis by subverting innate immunity via TLR3-mediated NLRP3 inflammasome inhibition. **Nature Communications**, v. 10, n. 5273, p. 1-17, 2019.

CASTANYS-MUÑOZ, E. et al. A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids: An ABC half-transporter from *Leishmania*. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1141-1153, 2007.

CASTANYS-MUÑOZ, E. et al. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3573-3579, 2008.

CHAVES, M. M. et al. The role of dermis resident macrophages and their interaction with neutrophils in the early establishment of *Leishmania major* infection transmitted by sand fly bite. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 11, p. 1-24, 2020.

CHOU, P. Y.; FASMAN, G. D. Empirical predictions of protein conformation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 47, p. 251-276, 1978.

COELHO, A. C. et al. Multiple mutations in heterogeneous miltefosine-resistant *Leishmania major* population as determined by whole genome sequencing. **PLoS**

Neglected Tropical Diseases, v. 6, n. 2, p. 1-11, 2012.

COELHO, A. C. Miltefosine susceptibility and resistance in *Leishmania*: from the laboratory to the field. **Journal of Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p.1-5, 2016.

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

CONDE, L. et al. Humoral response in Leishmaniasis. **Frontier Cellular infection microbiology**, v. 12, p. 1-8, 2022.

COSTA, D. N. C. C. et al. Controle da leishmaniose visceral canina por eutanásia: estimativa de efeito baseado em inquérito e modelagem matemática. **Cadernos de Saúde Pública** [online]. v. 36, n. 2, 2020b. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00221418>.

COSTA, C. H. N. et al. Household structure and urban services: Neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 229-236, 2005.

COSTA, M. M. et al. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: Identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 5, p. 2172-2184, 2011.

CORTAZZO DA SILVA, L., AOKI, J.I., FLOETER-WINTER, L.M. Finding Correlations Between mRNA and Protein Levels in *Leishmania* Development: Is There a Discrepancy? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.12, p.1-16, 2022.

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. 1-13, 2014.

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

CRUZ, A. K.; FREITAS-CASTRO, F. Genome and transcriptome analyses of *Leishmania* spp.: opening Pandora's box. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 64-69, 2019.

CULL, B. et al. Glycosome turnover in *Leishmania major* is mediated by autophagy. **Autophagy**, v. 10, n. 12, p. 2143-2157, 2014.

D'ANDREA, L. A. et al. The shadows of a ghost: a survey of canine leishmaniasis in Presidente Prudente and its spatial dispersion in the western region of São Paulo

state, an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 273, p. 1-7, 2015.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13, 2017.

DANTAS-TORRES, F. et al. Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. **Parasit Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2020.

DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531-538, 2012.

DEBONI, S. C. et al. **Boletim Epidemiológico**. Leishmaniose Visceral no Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul: Centro Estadual de Vigilância em Saúde, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2011. Disponível em: <https://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201812/27124724-n-1-marco.pdf>. Acesso em: 03 mar. 2021.

DIAS, Á. F. L. R. et al. Comparative study of the use of miltefosine, miltefosine plus allopurinol, and allopurinol in dogs with visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 217, n. 107947, p. 1-9, 2020.

DIAS, E. S. **Detecção de infecção por *Leishmania spp.* em flebotomíneos coletados na cidade de Florianópolis (SC)**. Belo Horizonte: Relatório Técnico-Científico, 2010. Disponível em: http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/29_12_2010_11.23.25.da431176e5d86a0650f1cc57ffbf749b.pdf. Acesso em: 03 mar. 2021.

DOMÍNGUEZ-ASENJO, B. et al. *Ex Vivo* phenotypic screening of two small repurposing drug collections identifies nifuratel as a potential new treatment against visceral and cutaneous Leishmaniasis. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 8, p. 2390-2401, 2021.

DON, R.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 140-146, 2014.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

DUMETZ, F. et al. Modulation of aneuploidy in *Leishmania donovani* during adaptation to different *In Vitro* and *In Vivo* environments and its impact on gene expression. **ASM Journals**, v. 8, n. 3, p. 1-14, 2017.

- EMINI, E. A. et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, v. 55, n. 3, p. 836-839, 1985.
- ESCH, K. J. et al. Activation of autophagy and nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing-like receptor family, Pypin domain-containing 3 inflammasome during *Leishmania infantum*-associated glomerulonephritis. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 8, p. 2105-2117, 2015.
- ESPADA, C. R. et al. *In Vitro* susceptibility to miltefosine of *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) isolates from different geographical areas in Brazil. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1-25, 2021.
- FARIA, A. R. et al. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, p. 1-9, 2011.
- FERNANDEZ-PRADA, C. et al. Different Mutations in a p-type ATPase transporter in *Leishmania* parasites are associated with cross-resistance to two leading drugs by distinct mechanisms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1-20, 2016.
- FERNANDEZ-PRADA, C. et al. High-throughput Cos-Seq screen with intracellular *Leishmania infantum* for the discovery of novel drug-resistance mechanisms. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 165-173, 2018.
- FERREIRA, B. A. et al. Isolation, typing, and drug susceptibility of *Leishmania (Leishmania) infantum* isolates from dogs of the municipality of Embu das Artes, an endemic region for canine leishmaniasis in Brazil. **Parasitology Research**, v. 12, n. 9, p. 2683-2695, 2022.
- FERREIRA, G. E. M. et al. The genetic structure of *Leishmania infantum* Populations in Brazil and its possible association with the transmission cycle of visceral Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. 1-10, 2012.
- FERREIRA-PAES, T. et al. Comparative analysis of biological aspects of *Leishmania infantum* strains. **PLoS One**, v. 15, n. 12, p. 1-16, 2020.
- FIALHO-JUNIOR, L. et al. Proteomic analysis reveals differentially abundant proteins probably involved in the virulence of amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, v. 120, n. 2, p. 679-692, 2021.
- FIGARELLA, K. et al. Biochemical characterization of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis. **Molecular Microbiology**, v. 65, p. 1006-1017, 2007.

FIGUEIREDO, F. B. et al. Leishmaniose visceral canina: dois casos autóctones no município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina. **Acta Centeia Veterinária**, v. 40, n. 1, p. 1-4, 2012.

FLORES, V.N.L. **Caracterização do perfil de transcrição de genes envolvidos na resistência à miltefosina em cepas de *Leishmania infantum* isoladas de cães naturalmente infectados**, 2021. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

FLORIANÓPOLIS. Secretaria Municipal de Saúde. **Relatório das atividades da leishmaniose visceral canina por meio de inquéritos caninos**. Florianópolis, 2021. Disponível em: <https://www.pmf.sc.gov.br/entidades/saude/index.php?cms=zoonoses+++leishmaniose+visceral>. Acesso em: 20 fev. 2022.

FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by leishmania lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

GARCIA, L. et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2294–2297, 2004.

GATTO, M. et al. Transcriptional analysis of THP-1 cells infected with *Leishmania infantum* indicates no activation of the inflammasome platform. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1-24, 2020.

GIAPITZOGLU, S. et al. Evaluation of serum symmetric dimethylarginine as a biomarker of kidney disease in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 277, p. 1-23, 2020.

GILLESPIE, P. M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2992-2995, 2016.

GOAD, L. J.; HOLZ JR, G. G.; BEACH, D. H. Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. **Molecular Biochemica Parasitology**, v. 10, n. 2, p. 161-70, 1984.

GÓMEZ PÉREZ, V. et al. Decreased antimony uptake and overexpression of genes of thiol metabolism are associated with drug resistance in a canine isolate of *Leishmania infantum*. **International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance**, v. 6, n. 2, p. 133-139, 2016.

GÓMEZ-OCHOA, P. et al. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 259-263, 2009.

GONÇALVES, A. A. M. et al. An overview of immunotherapeutic approaches against canine visceral leishmaniasis: What has been tested on dogs and a new perspective

on improving treatment efficacy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 1-27, 2019.

GONCALVES, R.; CHRISTENSEN, S. M.; MOSSER, D. M. Humoral immunity in leishmaniasis – Prevention or promotion of parasite growth? **Cytokine**, v. 2, n. 4, p. 1-6, 2020.

GONZÁLEZ-DE LA FUENTE, S. et al. Resequencing of the *Leishmania infantum* (strain JPCM5) genome and de novo assembly into 36 contigs. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-10, 2017.

GOUVEIA, A. L. A. et al. Thiazolidine derivatives: *In vitro* toxicity assessment against promastigote and amastigote forms of *Leishmania infantum* and ultrastructural study. **Experimental Parasitology**, v. 236-237, p. 236-237, 2022.

GOVERNO DE SANTA CATARINA. Nota Informativa Conjunta nº 0010/2022 - DIVE/SUV/SES/SC e CRMV/SC. **Orientações sobre a notificação obrigatória de casos suspeitos de Leishmaniose Visceral Canina (LVC)**. Florianópolis, 2022. Disponível em: <https://dive.sc.gov.br/phocadownload/notas-informativas/notas-informativas-2022/NI10.2022.pdf>. Acesso em: 10 set. 2022.

GOVERNO DE SANTA CATARINA. Secretaria de Estado Saúde de Santa Catarina. **Orienta Sobre Medidas Da Leishmaniose Visceral**. Diretoria de Vigilância Epidemiológica, 2017. Disponível em: <https://www.saude.sc.gov.br/index.php/noticias-geral/todas-as-noticias/1628-noticias-2017/5813-divesc-orienta-sobre-medidas-da-leishmaniose-visceral>. Acesso em: XX mês. 10 mar. 2023.

GOVERNO DE SANTA CATARINA. Secretaria de Estado Saúde de Santa Catarina. **Vigilância da leishmaniose visceral canina (LVC)**. Diretoria de Vigilância Epidemiológica, 2020. Disponível em: <https://dive.sc.gov.br/index.php/leishmaniose-visceral-canina>. Acesso em: 10 nov. 2021.

GOVERNO DE SANTA CATARINA. Secretaria de Estado Saúde de Santa Catarina. **Leishmaniose visceral humana**. Diretoria de Vigilância Epidemiológica, 2022. Disponível em: <https://www.dive.sc.gov.br/index.php/leishmaniose-visceral-humana>. Acesso em: 10 jan. 2023.

GOVERNO DE SANTA CATARINA. Secretaria de Estado Saúde de Santa Catarina. **Infográfico - Dados de HIV/Aids em Santa Catarina de 2011 a 2021**. Diretoria de Vigilância Epidemiológica, 2023. Disponível em: <https://dive.sc.gov.br/index.php/hiv-aids>. Acesso em: 10 mar. 2023.

GRÜNEBAST, J.; CLOS, J. *Leishmania*: Responding to environmental signals and challenges without regulated transcription. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 4016-4023, 2020.

- GUERFALI, F. Z. et al. Simultaneous gene expression profiling in human macrophages infected with *Leishmania major* parasites using SAGE. **BMC Genomics**, v. 9, n. 238, p. 1-18, 2008.
- GUPTA, N.; GOYAL, N.; RASTOGI, A. K. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Trends Parasitology**, v. 17, n. 3, p. 150-153, 2001.
- HAGER-BRAUN, C.; TOMER, K. B. Determination of protein-derived epitopes by mass spectrometry. **Expert Review of Proteomics**, v. 2, n. 5, p. 745–756, 2005.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics programa package for education and data analysis. **Palaeontologic Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- HASSANI, K.; OLIVIER, M. Immunomodulatory impact of *Leishmania*-induced macrophage exosomes: A comparative proteomic and functional analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1-18, 2013.
- HEBERLE, H. et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 169, p. 1-7, 2015.
- HENDRICKX, S. et al. Evidence of a drug-specific impact of experimentally selected paromomycin and miltefosine resistance on parasite fitness in *Leishmania infantum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 1914–1921, 2016.
- HORÁCIO, E. C. A. et al. Perspectives from systems biology to improve knowledge of *Leishmania* drug resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1-8, 2021.
- HORTON, P. et al. WoLF PSORT: Protein localization predictor. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 585-587, 2007.
- HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGU, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 95-115, 2017.
- HOUTVEN, J. V. et al. Constrained standardization of count data from massive parallel sequencing. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 11, p. 1-12, 2021.
- HUANG, Q. et al. SWATH enables precise label-free quantification on proteome scale. **Proteomics**, v. 15, n. 7, p. 1215-1223, 2015.
- IARUSSI, F. et al. Comparison of two dosing regimens of miltefosine, both in combination with allopurinol, on clinical and parasitological findings of dogs with leishmaniosis: a pilot study. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 1-10, 2020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE Cidades e Estados**. Brasília, 2022. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sc/florianopolis/panorama>. Acesso em: 16 set. 2022.

JARDIM, A. et al. Proteomic profiling of *Leishmania donovani* promastigote subcellular organelles. **Journal Proteome Research**, v. 17, n. 3, p. 1194-1215, 2018.

JERONIMO, S. M. B. et al. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: A genomewide scan. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 8, p. 1261-1269, 2007.

JONES, P. et. al. InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236-1240, 2014.

KARAMYSHEVA, Z. N.; GUARNIZO, S. A. G.; KARAMYSHEV, A. L. Regulation of translation in the protozoan parasite *Leishmania*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 1-15, 2020.

KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E. Prediction of chain flexibility in proteins. **Naturwissenschaften**, v. 72, p. 212-213, 1985.

KAZIMOTO, T. A. et al. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the prevalence and incidence of canine visceral leishmaniasis. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 18, n. 7, p. 356-363. 2018.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A; KEELING, J. H. New world and old world *Leishmania* infections a practical review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, p. 579-693, 2015.

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087-1096, 2007.

KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Lettets**, v. 276, n. 1-2, p. 172-174, 1990.

KOUTINAS, A. F. et al. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 98, n. 4, p. 247-261, 2001.

KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.

KULSHRESTHA, A. et al. Comparative transcript expression analysis of miltefosine-sensitive and miltefosine-resistant *Leishmania donovani*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 3, p. 1171-1184, 2014.

KUMAR, A. et al. Proteomic analyses of membrane enriched proteins of *Leishmania donovani* Indian clinical isolate by mass spectrometry. **Parasitology International**, v. 64, n. 4. p. 36-42, 2015.

LACHAUD, L. et al. Identification of *Leishmania* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using a free web-based application and a dedicated mass-spectral library. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 2924-2933, 2017.

LAHAV, T. et al. Multiple levels of gene regulation mediate differentiation of the intracellular pathogen *Leishmania*. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 2, p. 515-525, 2011.

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

LARANJEIRA-SILVA, M. F.; HAMZA, I.; PÉREZ-VICTORIA, J. M. Iron and heme metabolism at the *Leishmania*-host interface. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 3, p. 279-289, 2020.

LESTINOVA, T. et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1-27, 2017.

LIMA, I. D. et al. Changing demographics of visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Lessons for the future. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 1-16, 2018.

LONARDONI, M. V.; RUSSO, M.; JANCAR, S. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6355-6361, 2000.

LÓPEZ, K. et al. Risk factors, representations and practices associated with emerging urban human visceral leishmaniasis in Posadas, Argentina. **Biomedica**, v. 36, p. 51-63, 2016.

LOSADA-BARRAGÁN, M. et al. Proteomic profiling of splenic interstitial fluid of malnourished mice infected with *Leishmania infantum* reveals defects on cell proliferation and pro-inflammatory response. **Journal of Proteomics**, v. 208, p. 1-14, 2019.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; RIVAS, L. Miltefosine (Hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents**

and Chemotherapy, v. 51, n. 4, p. 1327-1332, 2007.

LYNN, M. A.; MARR, A. K.; MCMASTER, W. R. Differential quantitative proteomic profiling of *Leishmania infantum* and *Leishmania mexicana* density gradient separated membranous fractions. **Journal of Proteomics**, v. 82, p. 179-192, 2013.

MACHADO, C. A. L. et al. Spatial analysis and epidemiological profile of visceral leishmaniasis, northeastern Brazil: A cross-sectional study. **Acta Tropica**, v. 208, n. 105520, p. 1-8, 2020.

MADEIRA, F. et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 1, p. 1-4, 2022.

MAGALHÃES, R. D. M. et al. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. 1-14, 2014.

MAGOULAS, G. E. et al. Design, synthesis and antiparasitic evaluation of click phospholipids. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 1-37, 2021.

MAIA, G. A. et al. AnnotaPipeline: An integrated tool to annotate eukaryotic proteins using multi-omics data. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 1-9, 2022.

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

MALO, N. et al. Statistical practice in high-throughput screening data analysis. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 167-175, 2006.

MANNA, L. et al. Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2015.

MANZILLO, F. et al. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1-8, 2013.

MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Nota Técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA**. Brasília, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/produtos-veterinarios/legislacao-1/notas-tecnicas/nota-tecnica-no-11-2016-cpv-dfip-sda-gm-mapa-de-1-09-2016.pdf/view>. Acesso em: 20 nov. 2021.

MARCONDES, C. B. et al. Leishmaniasis. *In*: MARCONDES, C. B. **Arthropod Borne Diseases**. 1. ed. Cham, Switexerland: Springer Nature, 2017.

- MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 261-272, 2019.
- MATSUMOTO, P. S. S. et al. Impact of the dog population and household environment for the maintenance of natural foci of *Leishmania infantum* transmission to human and animal hosts in endemic areas for visceral leishmaniasis in São Paulo state, Brazil. **PLoS One**, v. 16, n. 8, p. 1-21, 2021.
- MCCONVILLE, M. J. et al. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. **Trends Parasitology**, v. 23, p. 368-375, 2007.
- MÉNEZ, C. et al. Interaction between miltefosine and amphotericin B: Consequences for their activities towards intestinal epithelial cells and *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3793-3800, 2006.
- MENEZES, J. P. B. et al. Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 9, p. 579-591, 2013.
- MICHELS, P. A. M. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, n. 12, p. 1463-77, 2006.
- MISHRA, J.; SINGH, S. Miltefosine resistance in *Leishmania donovani* involves suppression of oxidative stress-induced programmed cell death. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 397-406, 2013.
- MISTRY, J. et al. Pfam: The protein families database in 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, p. 1-8, 2021.
- MOHEBALI, M. et al. Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. **Acta Tropica**, v. 103, n. 1, p. 33-40, 2007.
- MOLINSPIRATION. **Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score**. 2022. Disponível em: <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. Acesso em: 20 out. 2022.
- MONDELAERS, A. et al. Genomic and molecular characterization of miltefosine resistance in *Leishmania infantum* strains with either natural or acquired resistance through experimental selection of intracellular amastigotes. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. 1-15, 2016.
- MONTE-NETO, R. et al. Intrachromosomal amplification, locus deletion and point mutation in the aquaglyceroporin AQP1 gene in antimony resistant *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1-19, 2015.

- MONTOYA, A. et al. Label-free quantitative proteomic analysis reveals potential biomarkers for early healing in cutaneous leishmaniasis. **PeerJ**, v. 6, p. 1-24, 2019.
- MORALES, M. A. et al. Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. **Proteomics**, v. 8, n. 2, p. 350-363, 2008.
- MOREIRA, W. et al. Proteomic analysis of metacyclogenesis in *Leishmania infantum* wild-type and PTR1 null mutant, **EuPA Open Proteomics**. v. 4, p. 171-183, 2014.
- MOREIRA, R. S. et al. EpiBuilder: A Tool for Assembling, Searching, and Classifying B-Cell Epitopes. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 16, p. 1-11, 2022.
- MUKHERJEE, A. K. et al. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: Role of TLR4 and TLR9. **International Immunopharmacology**. v. 12, n. 4, p. 565-572, 2012.
- MUKHERJEE, S.; BASU, S.; ZHANG K. Farnesyl pyrophosphate synthase is essential for the promastigote and amastigote stages in *Leishmania major*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 230, p. 8-15, 2019.
- NACIF-PIMENTA, R. et al. Conserved and distinct morphological aspects of the salivary glands of sand fly vectors of leishmaniasis: an anatomical and ultrastructural study. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2020.
- NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites. **Essays in Biochemistry**, v. 51, p. 81-95, 2011.
- REGLI, I. B. et al.. Survival mechanisms used by some *Leishmania* species to escape neutrophil killing. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1558, p. 1-8, 2017.
- NEGRÃO, F. et al. Lipidomic alterations of: *In vitro* macrophage infection by *L. infantum* and *L. amazonensis*. **Molecular BioSystems**, v. 13, n. 11, p. 2401-2406, 2017.
- NEGRÃO, F. et al. Label-Free proteomic analysis reveals parasite-specific protein alterations in macrophages following *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major*, or *Leishmania infantum* infection. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, p. 851-862, 2019a.
- NEGRÃO, F. et al. Tandem mass tag proteomic analysis of *in vitro* and *in vivo* models of cutaneous leishmaniasis reveals parasite-specific and nonspecific modulation of proteins in the host. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 2136-2147, 2019b.
- NOGUEIRA, F. S. et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2019.

- O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.
- OLÍAS-MOLERO, A. I. et al. Scientometric analysis of chemotherapy of canine leishmaniasis (2000-2020). **Parasites Vectors**, v. 14, p. 1-8, 2021.
- OPAS. Organização Pan-Americana. **Leishmanioses**: Informe epidemiológico nas Américas. OPAS: Washington, D.C, v. 11, 2022. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56832>. Acesso em: 27 mar. 2023.
- OTRANTO, D., DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends Parasitology**. v. 29, n.7, p. 339-345, 2013.
- 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.
- PACAKOVA, L. et al. Three types of *Leishmania mexicana* amastigotes: Proteome comparison by quantitative proteomic analysis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 12, p. 1-18, 2022.
- PAHO; WHO. Pan American Health Organization; World Health Organization. **Leishmaniasis**: Visceral Leishmaniasis. Washington: Pan American Health Organization: 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>. Acesso em: 27 mar. 2023.
- PALIĆ, S, et al. Systematic Review of Host-Mediated Activity of Miltefosine in Leishmaniasis through Immunomodulation. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.63, n.7, p. 1-15, 2019.
- PARKER, J.M, GUO, D., HODGES, R.S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**. v. 25, n. 19, p.5425-5432, 1986.
- PARREIRA DE AQUINO G. et al. Lipid and fatty acid metabolism in trypanosomatids. **Microbial Cell**, v. 8, n. 11, p. 262-275, 2021.
- PASQUALI, A. K. S. et al. Dispersion of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in central-southern Brazil: Evidence from an integrative approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. 1-20, 2019.
- 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.
- PEIXOTO, H. M.; DE OLIVEIRA, M. R. F.; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 3, p. 334-352, 2015.

PENNISI, M. G.; PERSICHETTI, M. F. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? **Veterinary Parasitology**, v. 251, p. 131-137, 2018.

PÉREZ-VICTORIA, F. et al. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 33, p. 23766-23775, ago. 2006a.

PÉREZ-VICTORIA, F. J. et al. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 9, n. 1-2, p. 26-39, 2006b.

PÉREZ-VICTORIA, F. J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2397-2403, 2003.

PESCHER, P. et al. Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 978-991, 2011.

PIERLEONI, A.; MARTELLI, P. L.; CASADIO, R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 392, p. 1-11, 2008.

PINEDA, C. et al. Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. **PloS One**, v. 12, n. 10, p. 1-18, 2017.

PINHO, N. et al. In-depth quantitative proteomics uncovers specie-specific metabolic programs in *Leishmania* (*Viannia*) species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1-21, 2020.

PIRES, S. F. et al. Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 4, p. 1860-1872, 2014.

PISSARRA, J. et al. Proteomic analysis of the promastigote secretome of seven *Leishmania* species. **Journal of Proteome Research**, v. 21, n. 1, p. 30-48, 2022.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1-25, 2017.

PRAJAPATI, V.K. et al. *In vitro* susceptibility of *Leishmania donovani* to miltefosine in Indian visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 4, p. 750-754, 2013.

PRAVA, J.; PAN, A. *In silico* analysis of Leishmania proteomes and protein-protein interaction network: Prioritizing therapeutic targets and drugs for repurposing to treat leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 229, p. 1-11, 2022.

RABHI, I. et al. Transcriptomic signature of *Leishmania* infected mice macrophages: A metabolic point of view. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1-11, 2012.

RAINEY, P.M. et al. Biochemical and molecular characterization of *Leishmania pifanoi* amastigotes in continuous axenic culture. **Molecular and Cellular Biochemistry Parasitology**, v. 49, p. 111-118, 1991.

RAKOTOMANGA, M. et al. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobiol Agents Chemother**, v. 51, n. 4, p. 1425-1430, 2007.

RAKOTOMANGA, M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P. M. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2677-2686, 2005.

RAPPSILBER, J.; ISHIHAMA, Y.; MANN, M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 663-670, 2003.

REIJNDERS, J.M.F.M, WATERHOUSE, R.M. Summary Visualisations of Gene Ontology Terms with GO-Figure! **BioRxiv**, v. 12, n. 2, p. 1-8, 2020.

REIS, L. L. D. et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638-645, 2017.

REZENDE, E. et al. Quantitative proteomic analysis of amastigotes from *Leishmania (L.) amazonensis* LV79 and PH8 strains reveals molecular traits associated with the virulence phenotype. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1-18, 2017.

RIBEIRO, R. R. et al. Canine leishmaniasis: An overview of the current status and strategies for control. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-12, 2018.

RIBEIRO, C. V. et al. Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 274, p.1-6, 2019.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, p. 1-18, 2010.

ROSAR, A. S. **Estudo da eficácia do Milteforan® no tratamento da leishmaniose visceral canina na região da grande Florianópolis, SC**. 2022. 115 f. Dissertação

(Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

ROSENZWEIG, D. et al. Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. **Proteomics**, v. 8, n. 9, p. 1843-1850, 2008a.

ROSENZWEIG, D. et al. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 590-602, 2008b.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103-111, 2018.

ROTH, V. M. D. **Doubling Time Calculator**. Versão 3.1.0. Doubling Time, 2006. Disponível em: https://doubling-time.com/compute_more.php. Acesso e: 10 jan. 2023.

RUIZ-POSTIGO, J. A.; GROUTA, R.-P. J.; JAINA, L. Global leishmaniasis surveillance, 2017-2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly epidemiological record World Health Organization**, v. 95, n. 25, p. 265-280, 2020.

SABOIA-VAHIA, L. et al. In-depth quantitative et al. Experimental proteome of *Leishmania infantum* promastigote and its usefulness for improving gene annotations. **Genes**, v. 11, n. 9, p. 1-20, 2020.

SANTOS, S. O. et al. The presence of *Lutzomyia longipalpis* in a focus of American visceral leishmaniasis where the only proven vector is *Lutzomyia cruzi*. Corumbá, Mato Grosso do Sul State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 633-634, 2003.

SARDAR, A. H. et al. Proteome changes associated with *Leishmania donovani* promastigote adaptation to oxidative and nitrosative stresses. **Journal of Proteomics**, v. 81, p. 185-199, 2013.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology Research**, v. 120, p. 1-14, 2021.

SEMINI, G. et al. Changes to cholesterol trafficking in macrophages by *Leishmania* parasites infection. **Microbiology Open**, v. 6, p. 1-13, 2017.

SEMINI, G. et al. *Leishmania* encodes a bacterium-like 2,4-Dienoyl-Coenzyme A reductase that is required for fatty acid β -Oxidation and intracellular parasite survival. **mBio**, v. 11, n. 3, p. 1-20, 2020.

SERAFIM, T. D. et al. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 548-555, 2018.

SEVÁ, A. P. et al. Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. 1-20, 2016.

SHAKARIAN, A. M. et al. Identification, characterization, and expression of a unique secretory lipase from the human pathogen *Leishmania donovani*. **Molecular Cell Biochemical**, v. 341, p. 17-31, 2010.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, n. 6, p. 412-23, 2009.

SIGRIST, C. J. A. et al. New and continuing developments at PROSITE. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 344-347, 2013.

SILVA, S. T. P et al. Leishmaniose visceral humana: reflexões éticas e jurídicas acerca do controle do reservatório canino no Brasil. **Revista Bioética y Derecho**, v. 39, p. 135-51, 2017.

SIMPSON, A. G. B. et al. Early evolution within kinetoplastids (euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. **Protist**, v. 155, n. 4, p. 407-422, 2004.

SINGH, A. K. et al. Proteomic-based approach to gain insight into reprogramming of THP-1 cells exposed to *Leishmania donovani* over an early temporal window. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 5, p. 1853-1868, 2015.

SIZOVA O.V. et al. Probing elongating and branching β -D-galactosyltransferase activities in *Leishmania* parasites by making use of synthetic phosphoglycans. **ACS Chemical Biology**. v.6, n.6. p.648-57, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 1-16, 2011.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. *Leishmania infantum*-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2016.

SOULAT, D.; BOGDAN, C. Function of macrophage and parasite phosphatases in leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1-21, 2017.

SOUZA, W. O Parasito e sua interação com o hospedeiro. *In*: BITTENCOURT, A. L. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SRIVASTAVA, S. et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. ***Parasites & Vectors***, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2016.

SRIVASTAVA, S. et al. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. ***Parasites & Vectors***, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2017.

STEINDEL, M. et al. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. ***Brazilian Journal of Veterinary Research***, v. 33, n. 4, p. 490-496, 2013.

TADELE, M. et al. *In vitro* growth inhibitory activity of medicines for malaria venture pathogen box compounds against *Leishmania aethiopica*. ***BMC Pharmacology & Toxicology***, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2021.

TANO F.T. et al. Proteome and morphological analysis show unexpected differences between promastigotes of *Leishmania amazonensis* PH8 and LV79 strains. ***PLoS One***, v. 23, n. 1, p. 1-26, 2022.

TASBIHI, M. et al. Mitochondrial proteome profiling of *Leishmania tropica*. ***Microbial Pathogenesis***, v. 133, p. 1-16, 2019.

TEIXEIRA, D. G. et al. Comparative analyses of whole genome sequences of *Leishmania infantum* isolates from humans and dogs in northeastern Brazil. ***International Journal Parasitology***, v. 47, n. 10-11, p. 655-665, 2017.

TÉLLEZ, J. et al. Knockdown of host antioxidant defense genes enhances the effect of glucantime on intracellular *Leishmania braziliensis* in human macrophages. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, v. 61, n. 7, p. 1-16, 2017.

THOMAS, P. D et al. PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. ***Protein Science: A Publication of the Protein Society***, v. 31, n. 1, p. 8-22, 2022.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. *Leishmania* and the model of predominant clonal evolution. ***Microorganisms***, v. 9, n. 11, p. 1-15, 2021.

TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. ***Research in Veterinary Science***, v. 130, p. 19-25, 2020.

TOMA, H.K et al. *Trypanosoma cruzi*: parasitaemia produced in mice does not seem to be related to in vitro parasite–cell interaction. ***International Journal for Parasitology***. v.30, n.5, p.592-597, 2000.

- TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n.1, p 1-13, 2018.
- TRAVI, B. L.; MIRÓ, G. Use of domperidone in canine visceral leishmaniasis: gaps in veterinary knowledge and epidemiological implications. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 11, p. 1-4, 2018.
- TSIGANKOV, P. et al. Phosphoproteomic analysis of differentiating *Leishmania* parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 7, p. 3405-3412, 2013.
- TURNER, K. G. et al. Fitness and phenotypic characterization of miltefosine-resistant *Leishmania major*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1-18, 2015.
- TYANOVA, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature Methods**, v. 13, n. 9, p. 731-740, 2016.
- ÜNLÜ, M.; MORGAN, M. E.; MINDEN, J. S. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. **Electrophoresis**, v. 18, n. 11, p. 2071-2077, 1997.
- VACCHINA, P. et al. A mitochondrial HSP70 (HSPA9B) is linked to miltefosine resistance and stress response in *Leishmania donovani*. **Parasites Vectors**, v. 9, n. 1-15, p. 1-15, 2016.
- VALE, D. L. et al. Serodiagnosis of canine leishmaniasis using a novel recombinant chimeric protein constructed with distinct B-cell epitopes from antigenic *Leishmania infantum* proteins. **Veterinary Parasitology**, v. 296, p. 1-8, 2021.
- 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.
- VERAS, P. S. T.; MENEZES, J. P. B. Using proteomics to understand how *Leishmania* parasites survive inside the host and establish infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1-15, 2016.
- VERMA, N. K.; DEY, C.S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobiol Agents Chemother**, v. 48, p. 3010-3015, 2004.
- VINCENT, I. M. et al. Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 4, p. 20-27, 2013.
- WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644-645, 2010.

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.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 10 jan. 2023.

WIŚNIEWSKI, J. R. et al. A “proteomic ruler” for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 12, p. 3497-3506, 2014.

WIŚNIEWSKI, J. R. Label-Free and standard-free absolute quantitative proteomics using the “total protein” and “proteomic ruler” approaches. **Methods Enzymology**, v. 585, 49-60, 2017.

XU, W. et al. Sterol biosynthesis is required for heat resistance but not extracellular survival in *Leishmania*. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1-18, 2014.

YAO, C.; WILSON, M. E. Dynamics of sterol synthesis during development of *Leishmania* spp. parasites to their virulent form. **Parasitology Vectors**, v. 12, n. 9, p. 1-12, 2016.

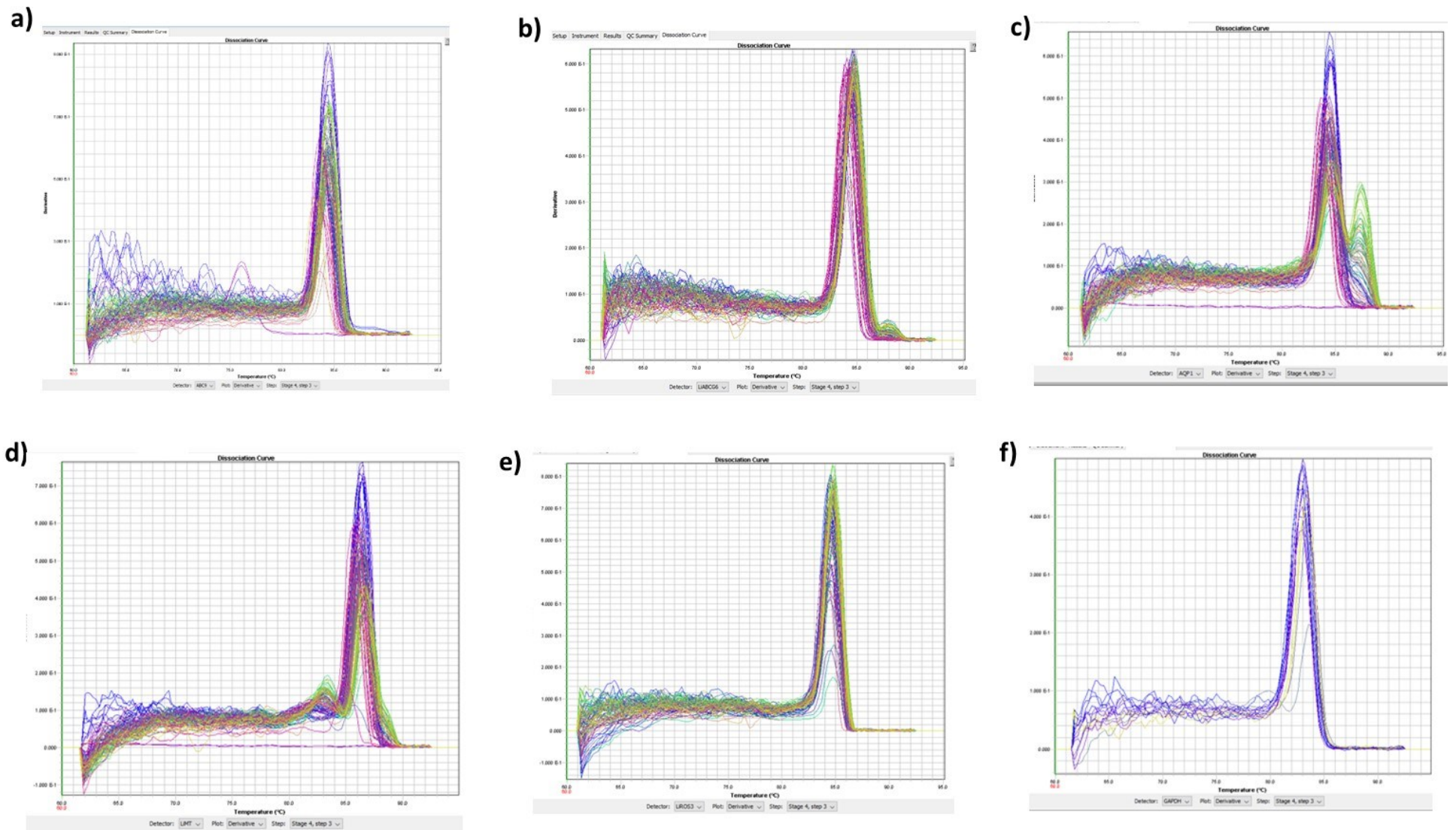
YAO, C. et al. Proteomic examination of *Leishmania chagasi* plasma membrane proteins: Contrast between avirulent and virulent (metacyclic) parasite forms. **Proteomics Clinical Applications**, v. 4, n. 1, p. 4-16, 2010.

YASUR-LANDAU, D. et al. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2016.

YE, J. et al. WEGO 2.0: uma ferramenta da web para analisar e plotar anotações GO, atualização de 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 71-75, 2018.

**ANEXO A – CURVA DE DISSOCIAÇÃO DOS INICIADORES DOS GENES ABCG4, ABCG6, AQP1, LIMT, LIROS3 E GAPDH
RELACIONADOS A SUSCETIBILIDADE A MILTEFOSINA EM *L. infantum***

Figura S1 – Curva de dissociação da reação de qPCR para os genes ABCG4, ABCG6, AQP1, LIMT, LIROS3 e GAPDH relacionados a suscetibilidade a miltefosina em *L. infantum*.



Curva de dissociação das reações de qPCR para os iniciadores que flanqueiam os fragmentos dos genes; a) ABCG4, b) ABCG6, c) AQP1, d) LiMT, e) LiROS3 e f) GAPDH.

LAMA_000234900 AARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT229
 LbrM.15.0930 TARQRTADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT240
 LdBPK_150950.1 TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 LdCL_150015000 TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 LINF_150017000 TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MCAN/BR/2010/LOBA TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MCAN/BR/2015/LUMA TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MCAN/BR/2016/NICK TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MCAN/BR/2017/JUJU TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MHOM/BR/2017/PC TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MCAN/BR/2018/MEG TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MCAN/BR/2018/PEKA TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MCAN/BR/2018/PENELOPE TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 TARRRVADVVKRSLTKCQDITLIGIPGILKGVSGGERKRANIGTELVTNPFVMLLDEPTT227
 :*:.*.*****:*****.*****

LAMA_000234900 GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS289
 LbrM.15.0930 GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS300
 LdBPK_150950.1 GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 LdCL_150015000 GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 LINF_150017000 GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MCAN/BR/2010/LOBA GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MCAN/BR/2015/LUMA GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MCAN/BR/2016/NICK GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MCAN/BR/2017/JUJU GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MHOM/BR/2017/PC GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MCAN/BR/2018/MEG GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MCAN/BR/2018/PEKA GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MCAN/BR/2018/PENELOPE GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 GLDSVNAVVRVGHLLQDLAKNDMRTVIATVHSPSSELFDFLFDLDDLLLLAKGHVYIHGPTADS287
 *****:*****

LAMA_000234900 IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAADNPNCLTPVTGA349
 LbrM.15.0930 IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEDILSQLWLAWEDYVMSDAARYNPCLTPVTGA360
 LdBPK_150950.1 IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 LdCL_150015000 IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 LINF_150017000 IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MCAN/BR/2010/LOBA IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MCAN/BR/2015/LUMA IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MCAN/BR/2016/NICK IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MCAN/BR/2017/JUJU IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MHOM/BR/2017/PC IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MCAN/BR/2018/MEG IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MCAN/BR/2018/PEKA IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MCAN/BR/2018/PENELOPE IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 IEYFASLGYDVPRTNPTPEYFMNLLQLPEEILSQLWLAWEDYVMSDAANDNPNCLTPVTGV347
 *****:*****

LAMA_000234900 ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF409
 LbrM.15.0930 ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF420
 LdBPK_150950.1 ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 LdCL_150015000 ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 LINF_150017000 ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MCAN/BR/2010/LOBA ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MCAN/BR/2015/LUMA ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MCAN/BR/2016/NICK ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MCAN/BR/2017/JUJU ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MHOM/BR/2017/PC ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MCAN/BR/2018/MEG ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MCAN/BR/2018/PEKA ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MCAN/BR/2018/PENELOPE ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 ITLTDYLEEQLKGANFCLQFSELFKRSWRMYLRDPGNFYGRSVQTLFFAIFVGLFFF407
 *****:*****

MCAN/BR/2020/OTTO_T0 PVTPLCTFPDGOAVIEYMGFGQWHYWQTFVALIVYQIGLRFIGATSLYYQGRQRGKLOF647
MCAN/BR/2020/TCHOPO_T0 PVTPLCTFPDGOAVIEYMGFGQWHYWQTFVALIVYQIGLRFIGATSLYYQGRQRGKLOF647
***** **.*.***.*:***.*:*****:*****:*****:***:*****

LAMA_000234900 VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDIESTLVGSIETPSNAYDTGASSFVNNRENNQPIWD709
LbrM.15.0930 VKNLRHRVASPRAIASARSNVDLSVQSTLVGSIATPSNAYGAETSL-RDHQEPHHSWLG719
LdBPK_150950.1 VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
LdCL_150015000 VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
LINF_150017000 VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MCAN/BR/2010/LOBA VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MCAN/BR/2015/LUMA VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MCAN/BR/2016/NICK VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MCAN/BR/2017/JUJU VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MHOM/BR/2017/PC VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MCAN/BR/2018/MEG VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MCAN/BR/2018/PEKA VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MCAN/BR/2018/PENELOPE VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MCAN/BR/2020/MEL_T0 VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MCAN/BR/2020/ZION_T0 VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MCAN/BR/2020/JACK_T0 VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MCAN/BR/2020/OTTO_T0 VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
MCAN/BR/2020/TCHOPO_T0 VKNLRKRVASPRAIASARSNDELSDVQSTLVGSIATPSNAYGTGVSSPINNPNHQPIWD707
*****:*****:***** **.*:***** *****:.* :. * :. :.*:

LAMA_000234900 GERERATLPSLDTPVITYVESPVVDVDMRRRKYRW743
LbrM.15.0930 NEIELAALSPLDTPVTFEESPI SVREKSHRY---750
LdBPK_150950.1 GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
LdCL_150015000 GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
LINF_150017000 GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MCAN/BR/2010/LOBA GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MCAN/BR/2015/LUMA GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MCAN/BR/2016/NICK GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MCAN/BR/2017/JUJU GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MHOM/BR/2017/PC GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MCAN/BR/2018/MEG GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MCAN/BR/2018/PEKA GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MCAN/BR/2018/PENELOPE GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MCAN/BR/2020/MEL_T0 GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MCAN/BR/2020/ZION_T0 GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MCAN/BR/2020/JACK_T0 GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MCAN/BR/2020/OTTO_T0 GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
MCAN/BR/2020/TCHOPO_T0 GESERATLALPDTPVITYVESPVVDVDMKPKRYRS741
.* * * : * *****: * * : . * :

ABCG6

LAMA_000335100 MSSPAPPTDRADAGLLHHLPHSFAE---SSAPPPASSHHKVLTWEDVSYTVSGDEGES57
LbrM.35.3110 MSSPAPPTVRADAGLLRHLSTSP---KSFMPASSQHKTVLTWEDVSYTIGSTEEDGS57
LdBPK_363040.1 MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
LdCL_360036800 MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
LINF_360036900 MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MCAN/BR/2010/LOBA MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MCAN/BR/2015/LUMA MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MCAN/BR/2016/NICK MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MCAN/BR/2017/JUJU MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MHOM/BR/2017/PC MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MCAN/BR/2018/MEG MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MCAN/BR/2018/PEKA MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MCAN/BR/2018/PENELOPE MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MCAN/BR/2020/MEL_T0 MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MCAN/BR/2020/ZION_T0 MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MCAN/BR/2020/JACK_T0 MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MCAN/BR/2020/OTTO_T0 MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
MCAN/BR/2020/TCHOPO_T0 MSSPAPPTDRADAGLLHHLHSHSPPESSPESSPPPPASSHRTAVLTWEDVSYTVSGADEGES60
***** *****: * * : * *****: . . *****: . . : * * *

LAMA_000335100 RTLVRHVFGYVQSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKVKSKGDI TGRILLNGEPVDPAA117
LbrM.35.3110 RTLIRHVSGYAQSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMGKGSITGSILLNGAPIESTA117
LdBPK_363040.1 RTLVRHVSGYVKS GEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGDI TGRIMLNGEPVEPAA120
LdCL_360036800 RTLVRHVSGYVKS GEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGDI TGRIMLNGEPVEPAA120
LINF_360036900 RTLVRHVSGYVKS GEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNI TGRIMLNGEPVEPAA120
MCAN/BR/2010/LOBA RTLVRHVSGYVKS GEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNI TGRIMLNGEPVEPAA120
MCAN/BR/2015/LUMA RTLVRHVSGYVKS GEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNI TGRIMLNGEPVEPAA120

MCAN/BR/2016/NICK RTLVHRHVSQVYKSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNITGRIMLNPEVEPAA120
 MCAN/BR/2017/JUJU RTLVHRHVSQVYKSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNITGRIMLNPEVEPAA120
 MHOM/BR/2017/PC RTLVHRHVSQVYKSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNITGRIMLNPEVEPAA120
 MCAN/BR/2018/MEG RTLVHRHVSQVYKSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNITGRIMLNPEVEPAA120
 MCAN/BR/2018/PEKA RTLVHRHVSQVYKSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNITGRIMLNPEVEPAA120
 MCAN/BR/2018/PENELOPE RTLVHRHVSQVYKSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNITGRIMLNPEVEPAA120
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 RTLVHRHVSQVYKSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNITGRIMLNPEVEPAA120
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 RTLVHRHVSQVYKSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNITGRIMLNPEVEPAA120
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 RTLVHRHVSQVYKSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNITGRIMLNPEVEPAA120
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 RTLVHRHVSQVYKSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNITGRIMLNPEVEPAA120
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 RTLVHRHVSQVYKSGEMLAVLGPAGKTTLLDILAQRKMKSKGNITGRIMLNPEVEPAA120
 : **.:*****: .**.* **:* ** *:::*

LAMA_000335100 FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTFSEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS177
 LbrM_35.3110 FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTFSEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS177
 LdBPK_363040.1 FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 LdCL_360036800 FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 LINF_360036900 FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MCAN/BR/2010/LOBA FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MCAN/BR/2015/LUMA FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MCAN/BR/2016/NICK FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MCAN/BR/2017/JUJU FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MHOM/BR/2017/PC FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MCAN/BR/2018/MEG FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MCAN/BR/2018/PEKA FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MCAN/BR/2018/PENELOPE FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 FRLCSGYVQVEDIMHSYVTVEEVVRFSATLRTSPTISEEALSRVSVLRLQLGIYHVRHS180
 ** *****:*****:*****: * * * * * **:* ***** ***,

LAMA_000335100 CIGSALVRGISGGQRKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV237
 LbrM_35.3110 CIGSALVRGISGGQRKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV237
 LdBPK_363040.1 CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 LdCL_360036800 CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 LINF_360036900 CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MCAN/BR/2010/LOBA CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MCAN/BR/2015/LUMA CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MCAN/BR/2016/NICK CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MCAN/BR/2017/JUJU CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MHOM/BR/2017/PC CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MCAN/BR/2018/MEG CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MCAN/BR/2018/PEKA CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MCAN/BR/2018/PENELOPE CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 CIGSALMRGISGGERKRCVAEMVTLPSLLFLDEPTTGLDTFTALHLLTLRLSLRSRGV240
 *****:*****:*****:***** * *****

LAMA_000335100 AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSSY\$NPNADYLI297
 LbrM_35.3110 AIIFSIHQPRFRIYETFDRIILLNGVGEAYFGPAADAMGFLAIEGLSPSYLGNPADYLI297
 LdBPK_363040.1 AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 LdCL_360036800 AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 LINF_360036900 AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MCAN/BR/2010/LOBA AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MCAN/BR/2015/LUMA AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MCAN/BR/2016/NICK AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MCAN/BR/2017/JUJU AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MHOM/BR/2017/PC AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MCAN/BR/2018/MEG AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MCAN/BR/2018/PEKA AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MCAN/BR/2018/PENELOPE AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 AVVFSIHQPRSRIYEVFDRVLLLVNGVGEAYFGPAADAVRFLAIEGLSSGCSNPNADYLI300
 *::***** ***,***:*****:*****: **:* ***** . *****

LAMA_000335100 DAVSVLPEVEEAWLSEEAQQAASAVEATTNGNQCLSPSPVSDTEERWEQLPSIAPTQGRDI357
 LbrM_35.3110 DAVSVLPEVEEAWLSEEAQQAASAVEATTNGNQCLSPSPVSDTEERWEQLPSIAPTQGRDI357
 LdBPK_363040.1 DAVSVLPEVEEAWLSEEAQQAASAVEATTNGNQCLSPSPVSDSKERWERLPSAAPTQGRDI360
 LdCL_360036800 DAVSVLPEVEEAWLSEEAQQAASAVEATTNGNQCLSPSPVSDSKERWERLPSAAPTQGRDI360
 LINF_360036900 DAVSVLPEVEEAWLSEEAQQAASAVEATTNGNQCLSPSPVSDSKERWERLPSAAPTQGRDI360
 MCAN/BR/2010/LOBA DAVSVLPEVEEAWLSEEAQQAASAVEATTNGNQCLSPSPVSDSKERWERLPSAAPTQGRDI360

LINF_360036900 SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MCAN/BR/2010/LOBA SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MCAN/BR/2015/LUMA SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MCAN/BR/2016/NICK SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MCAN/BR/2017/JUJU SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MHOM/BR/2017/PC SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MCAN/BR/2018/MEG SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MCAN/BR/2018/PEKA SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MCAN/BR/2018/PENELOPE SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 SVGALVTLNSYALCLLMSNLSKDYATGNILTSLLLVLVYLLPTGGMLVSLNSIPLMWRWIK600

..:*** **.*:***:*.**:*.:***:*.*****:***:* **

LAMA_000335100 HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYTKDIRSHLIVA657
 LbrM.35.3110 YVSFDRFVAFSALVANEFEGLSLVCDPVPVSDIAPCITSGSAYAASQGMYAKDIGPHALIVM657
 LdBPK_363040.1 HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 LdCL_360036800 HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 LINF_360036900 HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MCAN/BR/2010/LOBA HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MCAN/BR/2015/LUMA HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MCAN/BR/2016/NICK HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MCAN/BR/2017/JUJU HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MHOM/BR/2017/PC HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MCAN/BR/2018/MEG HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MCAN/BR/2018/PEKA HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MCAN/BR/2018/PENELOPE HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 HVSFARFVAFSVMVANEFDGLTFVCDPVPVSDIAPCITSGTAYAASQGMYAKDIRSHMLVVA660

:*** **.*:***:*.**:*.:***:*.*****:***:* **

LAMA_000335100 FSMVVYLVLGYLALRGFRSTEGK680
 LbrM.35.3110 ISMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK680
 LdBPK_363040.1 FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 LdCL_360036800 FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 LINF_360036900 FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MCAN/BR/2010/LOBA FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MCAN/BR/2015/LUMA FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MCAN/BR/2016/NICK FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MCAN/BR/2017/JUJU FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MHOM/BR/2017/PC FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MCAN/BR/2018/MEG FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MCAN/BR/2018/PEKA FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MCAN/BR/2018/PENELOPE FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 FSMVVYLVLGYLVLRGWRSTEGK683

:**.*:***:*.**:*.:***:*.*****:***:* **

AQUAPORINA (AQP1)

LAMA_EU429426.1 MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLENKRNFTLQNRWPLYKYR60
 LbrM.31.0020 -----MAIENHM--DEDQQQRQKRDLTAQDTWPLYRYR31
 LdBPK_310030.1 MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 LdCL_310005100 MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 LINF_310005100 MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 MCAN/BR/2010/LOBA MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 MCAN/BR/2015/LUMA MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 MCAN/BR/2016/NICK MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 MCAN/BR/2017/JUJU MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 MHOM/BR/2017/PC MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 MCAN/BR/2018/MEG MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 MCAN/BR/2018/PEKA MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 MCAN/BR/2018/PENELOPE MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNMHEEEEGQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60

MCAN/BR/2020/TCHOPO_TO MNSPTSTPPACYDAEVQLYMDKEDPEGVPIQNQMHEEEQOQLEGKRNFTSQNRWPLYKYR60
: *:*:* *:* * . *:*:*:*: *:*:*:*

LAMA_EU429426.1 WWIREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYLAIITFGWGFGLTIGLFL120
LbrM.31.0020 WWIREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYLAIITFGWGFGLTIGLFL120
LdBPK_310030.1 WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
LdCl_310005100 WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
LINF_310005100 WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MCAN/BR/2010/LOBA WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MCAN/BR/2015/LUMA WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MCAN/BR/2016/NICK WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MCAN/BR/2017/JUJU WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MHOM/BR/2017/PC WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MCAN/BR/2018/MEG WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MCAN/BR/2018/PEKA WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MCAN/BR/2018/PENELOPE WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MCAN/BR/2020/MEL_TO WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MCAN/BR/2020/ZION_TO WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MCAN/BR/2020/JACK_TO WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MCAN/BR/2020/OTTO_TO WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
MCAN/BR/2020/TCHOPO_TO WWLREYVAEFFGTFLLVTFGTGVIATTVFHAGNAASYQSNSSYMAITFGWGFGLTIGLFL120
*:

LAMA_EU429426.1 SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
LbrM.31.0020 TMGVSGHLNPAVTLANCAFAGFPWRKAPGFMLAQLLGAILGAANVYGLFKQHFDAGVM151
LdBPK_310030.1 SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
LdCl_310005100 SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
LINF_310005100 SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MCAN/BR/2010/LOBA SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MCAN/BR/2015/LUMA SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MCAN/BR/2016/NICK SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MCAN/BR/2017/JUJU SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MHOM/BR/2017/PC SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MCAN/BR/2018/MEG SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MCAN/BR/2018/PEKA SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MCAN/BR/2018/PENELOPE SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MCAN/BR/2020/MEL_TO SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MCAN/BR/2020/ZION_TO SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MCAN/BR/2020/JACK_TO SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MCAN/BR/2020/OTTO_TO SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
MCAN/BR/2020/TCHOPO_TO SMAVSGHLNPAVTLANCVFGTFPPWIKLPGYFLAQFLGGYVGAANTYMLFKSHFDDAQK180
*:

LAMA_EU429426.1 LSFSETMASKYSGIFATYPNVANAYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
LbrM.31.0020 LLPNETMASKYSGIFATYPNVANAYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
LdBPK_310030.1 LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
LdCl_310005100 LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
LINF_310005100 LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MCAN/BR/2010/LOBA LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MCAN/BR/2015/LUMA LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MCAN/BR/2016/NICK LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MCAN/BR/2017/JUJU LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MHOM/BR/2017/PC LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MCAN/BR/2018/MEG LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MCAN/BR/2018/PEKA LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MCAN/BR/2018/PENELOPE LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MCAN/BR/2020/MEL_TO LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MCAN/BR/2020/ZION_TO LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MCAN/BR/2020/JACK_TO LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MCAN/BR/2020/OTTO_TO LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
MCAN/BR/2020/TCHOPO_TO LLPNETMASKYSGIFATYPNVANTYAVWSEVFNTMALMMGILAITDPRMTPAVNYKPVAI240
*:

LAMA_EU429426.1 GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLAPRILSAILWGPEPFTLYSHYFWIPLVAPFVGALL300
LbrM.31.0020 GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLAPRILSAILWGPEPFTLYSHYFWIPLVAPFVGALL300
LdBPK_310030.1 GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFLLYSHYFWIPLVAPFVGALL300
LdCl_310005100 GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFLLYSHYFWIPLVAPFVGALL300
LINF_310005100 GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFLLYSHYFWIPLVAPFVGALL300
MCAN/BR/2010/LOBA GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFLLYSHYFWIPLVAPFVGALL300
MCAN/BR/2015/LUMA GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFLLYSHYFWIPLVAPFVGALL300
MCAN/BR/2016/NICK GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFLLYSHYFWIPLVAPFVGALL300
MCAN/BR/2017/JUJU GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFLLYSHYFWIPLVAPFVGALL300
MHOM/BR/2017/PC GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFLLYSHYFWIPLVAPFVGALL300
MCAN/BR/2018/MEG GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFLLYSHYFWIPLVAPFVGALL300
MCAN/BR/2018/PEKA GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFLLYSHYFWIPLVAPFVGALL300
MCAN/BR/2018/PENELOPE GLLLFVIGITPGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFLLYSHYFWIPLVAPFVGALL300

MCAN/BR/2020/MEL_T0 GLLLFVIGITGTGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFITLYSYFVIPLVAPFVGALL300
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 GLLLFVIGITGTGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFITLYSYFVIPLVAPFVGALL300
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 GLLLFVIGITGTGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFITLYSYFVIPLVAPFVGALL300
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 GLLLFVIGITGTGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFITLYSYFVIPLVAPFVGALL300
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 GLLLFVIGITGTGINSSYGLNPARDLSPRILSAMLWGSEPFITLYSYFVIPLVAPFVGALL300
 *****:****.*.***:***.***:****.***:*****.***:****.*.***

LAMA_EU429426.1 GMFLYVFFIIPPSF314
 LbrM.31.0020 GMFLYVFCIIPSGA285
 LdBPK_310030.1 GMFLYVFFIIPPNEF314
 LdCL_310005100 GMFLYVFFIIPPNEF314
 LINF_310005100 GMFLYVFFIIPPNEF314
 MCAN/BR/2010/LOBA GMFLYVFFIIPPNEF314
 MCAN/BR/2015/LUMA GMFLYVFFIIPPNEF314
 MCAN/BR/2016/NICK GMFLYVFFIIPPNEF314
 MCAN/BR/2017/JUJU GMFLYVFFIIPPNEF314
 MHOM/BR/2017/PC GMFLYVFFIIPPNEF314
 MCAN/BR/2018/MEG GMFLYVFFIIPPNEF314
 MCAN/BR/2018/PEKA GMFLYVFFIIPPNEF314
 MCAN/BR/2018/PENELOPE GMFLYVFFIIPPNEF314
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 GMFLYVFFIIPPNEF314
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 GMFLYVFFIIPPNEF314
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 GMFLYVFFIIPPNEF314
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 GMFLYVFFIIPPNEF314
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 GMFLYVFFIIPPNEF314
 ***** ** .

LIMIT

LAMA_000208300 MPNQPCWRKCLPTRLPGKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYFNNPEANAQFKYPSNFI60
 LbrM.13.1400 -----MEADVDEDAEVIVYMNNPELNAQFNYPNSNFI31
 LdBPK_131590.1 MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 LdCL_130020000 MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 LINF_130020800 MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MCAN/BR/2010/LOBA MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MCAN/BR/2015/LUMA MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MCAN/BR/2016/NICK MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MCAN/BR/2017/JUJU MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MHOM/BR/2017/PC MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MCAN/BR/2018/MEG MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MCAN/BR/2018/PEKA MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MCAN/BR/2018/PENELOPE MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 MPNQPCWRKCLSTRIFPDKLSKSFCCFSAEADVDEDDEVIVYLNDELNAQFNYPNSNFI60
 ***** **.*.***:***.***:****.***:*****.***:****.*.***

LAMA_000208300 RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 LbrM.13.1400 CTSKYTLISFLPLCLLFQFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGLSPWSPATSAVPLLVLTVALI91
 LdBPK_131590.1 RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 LdCL_130020000 RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 LINF_130020800 RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MCAN/BR/2010/LOBA RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MCAN/BR/2015/LUMA RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MCAN/BR/2016/NICK RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MCAN/BR/2017/JUJU RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MHOM/BR/2017/PC RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MCAN/BR/2018/MEG RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MCAN/BR/2018/PEKA RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MCAN/BR/2018/PENELOPE RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 RTSKYTLISFLPLSLLLEFKKVSNNLYFLMNVIFSLIPGVSPSPATSIAPLSFVLLVAIL120
 ****.*****.***:***:****.***:*****.***:****.*.***

LAMA_000208300 KEAVEDIKRHRADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 LbrM.13.1400 KEGVEDAKRHMADNRANSIAALVVRNGELVSVKSDIHPGDVMYIANGEEVRADVVMFAT151
 LdBPK_131590.1 KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 LdCL_130020000 KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 LINF_130020800 KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 MCAN/BR/2010/LOBA KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180

MCAN/BR/2015/LUMA KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSHKDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 MCAN/BR/2016/NICK KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSHKDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 MCAN/BR/2017/JUJU KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSHKDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 MHOM/BR/2017/PC KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSHKDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 MCAN/BR/2018/MEG KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSHKDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 MCAN/BR/2018/PEKA KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSHKDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 MCAN/BR/2018/PENELOPE KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSHKDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSHKDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSHKDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSHKDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSHKDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 KEGVEDIKRHQADNRANSILVQVLRNGKLVSVHSHKDIHPGDVMRIKNGEEVRADVVMLAS180
 .* ** *:*:***: . *:*:***:*****: * * .***:*****:..

LAMA_000208300 SLEEGQAFIDTCNLDGESNLKPRRALEVTWGLCKIETIMNTTAVLHTSKPDPGLLSWTGL240
 LbrM.13.1400 SVEEGQAFIDTCNLDGSETLKSRAKAVEATWPLCKVETIMNSTAVLHTSLPDPGLLSWTGL211
 LdBPK_131590.1 SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 LdCL_130020000 SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 LINF_130020800 SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MHOM/BR/2017/PC SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MCAN/BR/2010/LOBA SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MCAN/BR/2015/LUMA SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MCAN/BR/2016/NICK SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MCAN/BR/2017/JUJU SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MCAN/BR/2018/MEG SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MCAN/BR/2018/PEKA SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 MCAN/BR/2018/PENELOPE SVEEGQAFIDTCNLDGENTLKSRAKALEATWALCEVEAIMNSTAVLHTSKPDPGLLSWAGL240
 *.*****.***:.. *:*:***: * * .***:*****.*****.***

LbrM.13.1400 LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGIDTKLFRNLKPKPKSSNLDRKLN271
 LAMA_000208300 LEINGEEHALSLDQFLYRGCVLRNTDWAAGMIAYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 LdBPK_131590.1 LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 LdCL_130020000 LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 LINF_130020800 LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MCAN/BR/2010/LOBA LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MCAN/BR/2015/LUMA LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MCAN/BR/2016/NICK LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MCAN/BR/2017/JUJU LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MHOM/BR/2017/PC LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MCAN/BR/2018/MEG LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MCAN/BR/2018/PEKA LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MCAN/BR/2018/PENELOPE LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 LEINGEEHALSLNQFLYRGCVLRNTDWWVGMVYAGVDTKLFRLNPKPKPKSSNLDRKLN300
 .***:*****.***:.. *:*:***: * * .***:*****.*****.***

LAMA_000208300 YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 LbrM.13.1400 YLIIAILIFQVQVMLFIIASMAVWVWNSRHRDHPYLFIFIFEMHKGRLWGRYLTYFILLSY331
 LdBPK_131590.1 YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 LdCL_130020000 YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 LINF_130020800 YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MCAN/BR/2010/LOBA YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MCAN/BR/2015/LUMA YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MCAN/BR/2016/NICK YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MCAN/BR/2017/JUJU YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MHOM/BR/2017/PC YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MCAN/BR/2018/MEG YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MCAN/BR/2018/PEKA YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MCAN/BR/2018/PENELOPE YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 YFIIAILIFQNIIMLFILASMAVWVWNSKYRETPYLRFIFISFRKNVTLWGRYLSYFILLSY360
 *.*****:*****:*****:..: * * * * .:.. * * * * :*****:*****

LAMA_000208300 CVPISLFTIEVCKVIAQAWMRVDCMLMEYMNNRWRHCPNTSNLNEQLAMVRFIFSDKT420
 LbrM.13.1400 CVPISLFTIEVCKVIEQAWMRVDCMLMEYMNNRWRHCLPNTSNLNEQLAMVRFIFTDKT391
 LdBPK_131590.1 CVPISLFTIEVCKVQVQAWMRVDCMLMEYMSNRWRHCPNTSNLNEQLAMVRFIFSDKT420
 LdCL_130020000 CVPISLFTIEVCKVQVQAWMRVDCMLMEYMSNRWRHCPNTSNLNEQLAMVRFIFSDKT420
 LINF_130020800 CVPISLFTIEVCKVQVQAWMRVDCMLMEYMSNRWRHCPNTSNLNEQLAMVRFIFSDKT420

MCAN/BR/2010/LOBA CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 MCAN/BR/2015/LUMA CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 MCAN/BR/2016/NICK CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 MCAN/BR/2017/JUJU CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 MHOM/BR/2017/PC CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 MCAN/BR/2018/MEG CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 MCAN/BR/2018/PEKA CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 MCAN/BR/2018/PENELOPE CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 MCAN/BR/2020/MEL_TO CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 MCAN/BR/2020/ZION_TO CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 MCAN/BR/2020/JACK_TO CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 MCAN/BR/2020/OTTO_TO CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 MCAN/BR/2020/TCHOPO_TO CVPISLFTITIEVCKVVQAQWMRVDCLMMEYMSNRWRHCQPNTSNLNEQLAMVRFIFS DKT420
 *****:***:***:***** ***** ***** ***** *****:***

LAMA_000208300 GTLTENVMKFKQGDALGPIEADSLDKCIVQLRKETESKRLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 LbrM.13.1400 GTLTENVMKFKRGEALGPIESDRLDETIARLRKEESKGLGQLQEYFLALALCNTVQPF451
 LdBPK_131590.1 GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 LdCL_130020000 GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 LINF_130020800 GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MCAN/BR/2010/LOBA GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MCAN/BR/2015/LUMA GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MCAN/BR/2016/NICK GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MCAN/BR/2017/JUJU GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MHOM/BR/2017/PC GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MCAN/BR/2018/MEG GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MCAN/BR/2018/PEKA GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MCAN/BR/2018/PENELOPE GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MCAN/BR/2020/MEL_TO GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MCAN/BR/2020/ZION_TO GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MCAN/BR/2020/JACK_TO GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MCAN/BR/2020/OTTO_TO GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 MCAN/BR/2020/TCHOPO_TO GTLTENVMKFKLGDALGNPIDADNLDECIAQLRKEAESKGLGPLQEYFLALALCNTVQPF480
 ***** *:* ** *: * .***** ** * **********

LAMA_000208300 KDDTDLGVSIVIEGSSPDEVALVETAAAVGYRLINRTTKSITLLQNDTRKVYNILATLEF540
 LbrM.13.1400 EDDTADFIVIEGTSPDEVALVQTAAGYRLTYRTTKITITILLHNNTQKVYNILATLEF511
 LdBPK_131590.1 KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 LdCL_130020000 KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 LINF_130020800 KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MCAN/BR/2010/LOBA KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MCAN/BR/2015/LUMA KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MCAN/BR/2016/NICK KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MCAN/BR/2017/JUJU KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MHOM/BR/2017/PC KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MCAN/BR/2018/MEG KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MCAN/BR/2018/PEKA KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MCAN/BR/2018/PENELOPE KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MCAN/BR/2020/MEL_TO KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MCAN/BR/2020/JACK_TO KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MCAN/BR/2020/ZION_TO KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MCAN/BR/2020/OTTO_TO KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 MCAN/BR/2020/TCHOPO_TO KDDTDDLGVVYEGSSPDEVALVETAAAVGYRLISRTTKSITLLLDHGTTRKVYNILATLEF540
 :*** .: .:***:*****:***.*** *****:***:***:***:*****

LAMA_000208300 TPDRKMMSIIVEDSDTKQIMLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 LbrM.13.1400 TPERKIMSIVVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 LdBPK_131590.1 TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 LdCL_130020000 TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 LINF_130020800 TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MCAN/BR/2010/LOBA TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MCAN/BR/2015/LUMA TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MCAN/BR/2016/NICK TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MCAN/BR/2017/JUJU TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MHOM/BR/2017/PC TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MCAN/BR/2018/MEG TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MCAN/BR/2018/PEKA TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MCAN/BR/2018/PENELOPE TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MCAN/BR/2020/MEL_TO TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MCAN/BR/2020/ZION_TO TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MCAN/BR/2020/JACK_TO TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MCAN/BR/2020/OTTO_TO TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 MCAN/BR/2020/TCHOPO_TO TPDRKMMSIIVEDSDTKKITLYNKGADSFIRPQLSRAPDVQGHIEVSDIPLTEMSSSGLR600
 :*:*:*****:* * .***** *****:***:***:***:*****

LAMA_000208300 TLLVCAKDITRRQFDLWYEFVVGKSLHNRSSKIDKVCLEMEQDMRLVGATAIEDKLDQ660
 LbrM.13.1400 TLLVCARDITRRQFDPLWVNFTEAGKSLHNRSSVTDKVCLEMEKEMRLVGATAIEDKLDQ631
 LdBPK_131590.1 TLLVCAKDITRRQFDLWYEFVVGKSLHNRSSKIDKVCLEMEQDMRLVGATAIEDKLDQ660
 LdCL_130020000 TLLVCAKDITRRQFDLWYEFVVGKSLHNRSSKIDKVCLEMEQDMRLVGATAIEDKLDQ660

MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 QNYRYFTASVDYSQLSGRASAI SKMCAFFRFPGEATGDSVSGYYPNPGAYPWAMFNDSIS180
 ****:*.***: ** * .: * *****.:* * *****:*****

LAMA_000659100 LYRMDGTLICDGGAFTV DGRSLADNKCVKSGIAR KSDVKERFKPPRLIPGNPMPWSAGG240
 LbrM.32.0580 LYTMNGTLICDGGAFTLNGTSLRADNKCVK TGIARRD VNRVYKPPREIPGQGPMPWSAGG240
 LdBPK_320540.1 LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 LdCL_320010900 LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 LINF_320010400 LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MCAN/BR/2010/LOBA LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MCAN/BR/2015/LUMA LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MCAN/BR/2016/NICK LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MCAN/BR/2017/JUJU LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MHOM/BR/2017/PC LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MCAN/BR/2018/MEG LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MCAN/BR/2018/PEKA LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MCAN/BR/2018/PENELOPE LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 LYRTDGTLICDGS AFTANGTSLAANNKCVKSGIARPSDV KERYNPPREIPGNPMPWSAGG240
 ** :*****.*** .* ** :*****:*** **: *.:*** **.:*****.**

LAMA_000659100 DKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PFNVDEDLIVWLD PFTSDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 LbrM.32.0580 NMSATDPFLKQGY YFGEPGHNI PSSLEDELMVWLD PAFSTDVAKDYRI INVLGPAGDYFF300
 LdBPK_320540.1 NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 LdCL_320010900 NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 LINF_320010400 NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MCAN/BR/2010/LOBA NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MCAN/BR/2015/LUMA NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MCAN/BR/2016/NICK NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MCAN/BR/2017/JUJU NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MHOM/BR/2017/PC NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MCAN/BR/2018/MEG NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MCAN/BR/2018/PEKA NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MCAN/BR/2018/PENELOPE NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 NKSATDPYLR EGYYPQEPGHKI PLSIDEDLIVWLD PAFSTDVTKNYRILNVDLPAGDYFF300
 : *****:*.***: ****:* .:****:*****:*****:****:*. *****

LAMA_000659100 EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTALIMAVTLLSVKCLIRP360
 LbrM.32.0580 EITIEQFPTS PYGTEKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTALIMAVTLLSVKCLIRP360
 LdBPK_320540.1 EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 LdCL_320010900 EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 LINF_320010400 EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MCAN/BR/2010/LOBA EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MCAN/BR/2015/LUMA EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MCAN/BR/2016/NICK EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MCAN/BR/2017/JUJU EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MHOM/BR/2017/PC EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MCAN/BR/2018/MEG EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MCAN/BR/2018/PEKA EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MCAN/BR/2018/PENELOPE EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MCAN/BR/2020/OTTO_T0 EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 EITEQYPTAPY ASHKFVQLATRSWIGGRSHV LGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPV360
 ** *.**:*.*.:***** *****:.* **:*.*.*.*.*.*.*: **.*: .: *

LAMA_000659100 YTE363
 LbrM.32.0580 YTK363
 LdBPK_320540.1 YTE363
 LdCL_320010900 YTE363
 LINF_320010400 YTE363
 MCAN/BR/2010/LOBA YTE363
 MCAN/BR/2015/LUMA YTE363
 MCAN/BR/2016/NICK YTE363
 MCAN/BR/2017/JUJU YTE363
 MHOM/BR/2017/PC YTE363
 MCAN/BR/2018/MEG YTE363
 MCAN/BR/2018/PEKA YTE363
 MCAN/BR/2018/PENELOPE YTE363
 MCAN/BR/2020/MEL_T0 YTE363
 MCAN/BR/2020/ZION_T0 YTE363
 MCAN/BR/2020/JACK_T0 YTE363

MCAN/BR/2020/OTTO_T0 YTE363
MCAN/BR/2020/TCHOFO_T0 YTE363
** :

*LAMA_: *Leishmania amazonensis*; LbrM.: *Leishmania braziliensis*; LdBPK_: *Leishmania donovani* BPK282A1; LdCL_: *Leishmania donovani* CL-SL; LINF_: *Leishmania infantum* JPCM5; MCAN: isolados de *Leishmania infantum* isoladas a partir de cães; MHOM: isolado de *Leishmania infantum* isolada de humano. Os aminoácidos idênticos estão grifados em cinza, enquanto aminoácidos discordantes estão em branco. Ao final de cada grupo de comparação, os “*” significam resíduos idênticos a todas as sequências (propriedades dos aminoácidos idênticas); “:” demonstra resíduos de aminoácidos muito similares e “.” demonstra resíduos de aminoácidos pouco similares, um espaço (gap) no lugar da comparação significa diferença no aminoácido numa das sequências e hífen (-) indicam (gaps) espaços.

Gene LiMT

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)
(1) LAMA_000208300	100.00	81.35	92.38	92.38	92.44	92.44	92.44	92.44	92.44	92.44	92.44	92.44	92.44	92.44	92.44	92.44	92.44	92.44
(2) LbrM.13.1400	81.35	100.00	82.66	82.66	82.69	82.69	82.69	82.69	82.69	82.69	82.69	82.69	82.69	82.69	82.69	82.69	82.69	82.69
(3) LdBPK_131590.1	92.38	82.66	100.00	100.00	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88
(4) LdCL_130020000	92.38	82.66	100.00	100.00	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88	99.88
(5) LINF_130020800	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(6) MCAN/BR/2010/LOBA	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(7) MCAN/BR/2015/LUMA	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(8) MCAN/BR/2016/NICK	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(9) MCAN/BR/2017/JUJU	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(10) MHOM/BR/2017/PC	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(11) MCAN/BR/2018/MEG	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(12) MCAN/BR/2018/PEKA	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(13) MCAN/BR/2018/PENELOPE	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(14) MCAN/BR/2020/MEL_T0	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(15) MCAN/BR/2020/ZION_T0	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(16) MCAN/BR/2020/JACK_T0	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(17) MCAN/BR/2020/OTTO_T0	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
(18) MCAN/BR/2020/TCHOPO_T0	92.44	82.69	99.88	99.88	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

Gene LiROS3

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)
(1) LAMA_000659100	77.38	100.00	90.20	90.20	90.20	90.20	90.20	90.20	90.20	90.20	90.20	90.20	90.20	90.20	90.20	90.20	90.48	90.57
(2) LbrM.32.0580	100.00	77.38	79.21	79.21	79.21	79.21	79.21	79.21	79.21	79.21	79.21	79.21	79.21	79.21	79.21	79.21	79.30	79.21
(3) LdBPK_320540.1	79.30	90.48	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73	99.73	100.00	99.91
(4) LdCL_320010900	79.21	90.57	99.63	99.63	99.63	99.63	99.63	99.63	99.63	99.63	99.63	99.63	99.63	99.63	99.63	99.63	99.91	100.00
(5) LINF_320010400	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(6) MCAN/BR/2010/LOBA	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(7) MCAN/BR/2015/LUMA	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(8) MCAN/BR/2016/NICK	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(9) MCAN/BR/2017/JUJU	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(10) MHOM/BR/2017/PC	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(11) MCAN/BR/2018/MEG	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(12) MCAN/BR/2018/PEKA	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(13) MCAN/BR/2018/PENELOPE	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(14) MCAN/BR/2020/MEL_T0	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(15) MCAN/BR/2020/ZION_T0	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(16) MCAN/BR/2020/JACK_T0	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(17) MCAN/BR/2020/OTTO_T0	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63
(18) MCAN/BR/2020/TCHOPO_T0	79.21	90.20	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.73	99.63

* MCAN: isolados de *Leishmania infantum* isoladas a partir de cães; MHOM: isolado de *Leishmania infantum* isolada de humano.

(1) LAMA_: *Leishmania amazonensis*; (2) LbrM.: *Leishmania braziliensis*; (3) LdBPK_: *Leishmania donovani* BPK282A1; (4) LdCL_: *Leishmania donovani* CL-SL; (5) LINF_: *Leishmania infantum* JPCM5; (6) MCAN/BR/2010/LOBA; (7) MCAN/BR/2015/LUMA; (8) MCAN/BR/2016/NICK; (9) MCAN/BR/2017/JUJU; (10) MHOM/BR/2017/PC; (11) MCAN/BR/2018/MEG; (12) MCAN/BR/2018/PEKA; (13) MCAN/BR/2018/PENELOPE; (14) MCAN/BR/2020/MEL_T0; (15) MCAN/BR/2020/ZION_T0; (16) MCAN/BR/2020/JACK_T0; (17) MCAN/BR/2020/OTTO_T0 e (18) MCAN/BR/2020/TCHOPO_T0.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

ANEXO D – DISTRIBUIÇÃO DAS 494 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO PROTEOMA TOTAL DOS SEIS ISOLADOS DOS CÃES JACK, OTTO E TCHOPO

Tabela S2 - Proteínas identificadas no proteoma total dos seis isolados dos cães Jack, Otto e Tchopo quando tratados e não tratados com miltefosina por análise de LC_MS

ID	Proteína	Grupo Funcional (Literatura)	Localização Subcelular	Abundância Aumentada	TDM	PS
A0A6L0XL35	Phosphoglycan_beta_1_-3_galactosyltransferase_5	Proteólise	Mitocôndria		0	Ausente
A4I763	Ubiquinol-cytochrome-c reductase-like protein	Metabolismo Energético	Secretada		0	Ausente
A0A6L0WQS7	Lipase_(Class_3)_-_putative	Metabolismo de Lipídeo	Membrana plasmática	↑	0	Ausente
E9AHP6	Kinesin motor domain-containing protein	Citoesqueleto	Núcleo		0	Ausente
A4I7A2	Acetyl-CoA carboxylase	Metabolismo de aminoácido	Citoesqueleto		0	Ausente
A4HSB4	Fructose-bisphosphatase	Metabolismo Carboidrato ^{GGG}	Mitocôndria		0	Ausente
A4HY08	Putative pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	Metabolismo Carboidrato ^{GGC}	Mitocôndria		0	Ausente
A4HY91	malate dehydrogenase, glycosomal	Metabolismo Carboidrato ^{GGG}	Mitocôndria		0	Ausente
A4I0C2	Acetyl-coenzyme A synthetase	Metabolismo Carboidrato ^{GGC}	Membrana plasmática		1	Ausente
A4I2Y7	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	Metabolismo Carboidrato ^{GGC}	Citoplasma	↑↑	0	Ausente
A4I4W5	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	Metabolismo Carboidrato ^{GGG}	Citoplasma		0	Ausente
A4I5X6	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase - glycosomal	Metabolismo Carboidrato ^{GGG}	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I3X3	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	Metabolismo de Aminoácido/ Metabolismo Carboidrato ^{GGC}	Mitocôndria		0	Ausente
E9AGT9	phosphoglycerate kinase C - glycosomal	Metabolismo Carboidrato ^{GGG}	Citoplasma	↑	1	Ausente
A4I9I3	Malate dehydrogenase	Metabolismo Carboidrato ^{GGC}	Mitocôndria		0	Ausente
A4I076	Putative NADP-dependent alcohol dehydrogenase	Metabolismo Carboidrato ^{GGC}	Citoplasma		0	Ausente
A0A6L0XQ08	Aldose_1-epimerase_-putative	Metabolismo Carboidrato ^{GGG}	Mitocôndria		0	Ausente
A0A6L0XQ92	Triosephosphate isomerase	Metabolismo Carboidrato ^{GGG}	Citoplasma	↑	0	Ausente

A4I1L9	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	Metabolismo Carboidrato ^{GGG}	Mitocôndria		0	Ausente
A4ICH2	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	Metabolismo de Aminoácido/ Metabolismo Carboidrato ^{GGG}	Mitocôndria		0	Ausente
E9AHZ7	Phosphoglycerate mutase (2,3-diphosphoglycerate-independent)	Metabolismo Carboidrato ^{GGC}	Mitocôndria		0	Ausente
A4ICK8	Fructose-bisphosphate aldolase	Metabolismo Carboidrato ^{GGG}	Mitocôndria		0	Ausente
A4IDK9	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	Metabolismo Carboidrato ^{GGG}	Mitocôndria		0	Ausente
A0A6L0Y0Y0	Pyruvate kinase	Metabolismo Carboidrato ^{GGC}	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A0A6L0WR57	Phosphopyruvate hydratase	Metabolismo Carboidrato ^{GGC}	Citoesqueleto		0	Ausente
Q3C165	Glucose-6-phosphate isomerase	Metabolismo Carboidrato ^{GGG}	Citoplasma	↑	0	Ausente
A0A142BXX3	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (Fragment)	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma		0	Ausente
A4HRK0	Probable eukaryotic initiation factor 4A	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A0A381MAQ7	60S ribosomal protein L7a	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A0A381MCG8	40S ribosomal protein S5	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A0A6L0WW89	Tubulin alpha chain	Citoesqueleto	Citoesqueleto		0	Ausente
A0A6L0XA47	Histone H2B	Transcrição/ Síntese proteica	Núcleo		0	Ausente
A0A6L0XFB7	ATP synthase subunit beta	Metabolismo Energético	Mitocôndria	↑	0	Ausente
P62884	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	Metabolismo de Nucleotídeo	Núcleo		0	Ausente
A0A6L0XR31	D-isomer_specific_2-hydroxyacid_dehydrogenase-_protein	Outros metabolismos	Citoplasma	↑	0	Ausente
A0A381MVV3	Putative 40S ribosomal protein S18	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4HRG4	40S ribosomal protein S7	Síntese de Proteína	Mitocôndria		0	Ausente
A4HW98	Histone H4	Transcrição/ Síntese proteica	Núcleo		0	Ausente
Q9N9V3	Putative ribosomal protein L10	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4HRT1	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase - putative	Metabolismo de Aminoácido	Mitocôndria		0	Ausente
A4HSP6	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	Outros metabolismos	Núcleo	↑	0	Ausente
A4HSP4	Histone H4	Transcrição/ Síntese proteica	Núcleo		0	Ausente
A4HTP4	Stress-induced protein sti1	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HU13	Calmodulin	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente

A4HUG3	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma		1	Ausente
A4HUD9	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	Metabolismo Carboidrato	Mitocôndria		0	Ausente
A0A6L0WJL3	Leishmanolysin	Proteólise/Fator de virulência	Membrana plasmática		1	Ausente
A4HTM6	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4HSG0	Putative microtubule-associated protein	Citoesqueleto	Núcleo		0	Ausente
A4HUT6	Proteasome subunit alpha type	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A4HTB3	Splicing factor ptrs1-like protein	Transcrição	Núcleo		0	Ausente
A4HV26	Putative 40S ribosomal protein S15A	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4HSF7	Trypanothione reductase	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4HVI6	40S ribosomal protein S12	Síntese de Proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HUX3	Putative aminopeptidase	Proteólise	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A0A6L0WMD1	Alba_- putative	Outros metabolismos	Mitocôndria		0	Ausente
A4HV12	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Secretada		0	Ausente
A4HUS2	Serine--tRNA ligase	Síntese de proteína	Núcleo		0	Ausente
A4HV09	Pyruvate, phosphate dikinase	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
E9AGK4	Pyrroline-5-carboxylate reductase	Metabolismo de Aminoácido	Citoplasma	↑↑	0	Ausente
E9AHL5	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	Síntese de Proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HW39	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma/Núcleo	↑	0	Ausente
E9AG43	Putative 26S protease regulatory subunit	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A4HSC2	Actin	Citoesqueleto	Citoesqueleto		0	Ausente
A4HW91	cytoskeleton associated protein, putative	Proteólise	Núcleo		0	Ausente
A4HSH2	ATPase alpha subunit	Transporte mediado por vesícula	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A0A6L0WT36	Tb-292_membrane_associated_protein-like_protein	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4HTP3	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
Q9BHZ6	Elongation factor-1 gamma	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4HUU6	Putative 14-3-3 protein	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma		0	Ausente
A4HV19	Putative 60S ribosomal protein L28	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A4HW29	Putative calpain-like cysteine peptidase	Proteólise/Fator de virulência	Citoplasma		0	Ausente
A4HVE5	Putative carboxypeptidase	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A4HWJ8	60S ribosomal protein L6	Síntese de Proteína	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A4HVN7	Putative proteasome regulatory ATPase subunit 2	Proteólise	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4HWZ0	Sucrose-phosphate synthase-like protein	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma		0	Ausente

A4HWV2	Orotidine-5-phosphate decarboxylase/urotate phosphoribosyltransferase	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma	↑	0	Ausente
A0A6L0X151	60S_acidic_ribosomal_protein_P2	Síntese de Proteína	Mitocôndria		0	Ausente
A4HXD8	Acyl-CoA-binding protein homolog 3	Metabolismo de Lipídeo	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HX73	Elongation factor 1-alpha	Síntese de Proteína/Fator de virulência	Citoplasma		0	Ausente
A4HWJ9	NAD-specific glutamate dehydrogenase	Metabolismo de Aminoácido	Mitocôndria	↑	1	Ausente
A4HWN5	Ribonucleoprotein	Síntese de Proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HWU4	Putative 60S ribosomal protein L21	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A0A6L0X6L0	Aconitate hydratase	Metabolismo Energético	Mitocôndria		0	Ausente
A4HY01	Mitochondrial carrier protein - putative	Transportador Mitochondrial	Secretada		3	Ausente
E9AGQ5	Putative heat shock protein	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4HY43	ADP/ATP translocase	Transportador Mitochondrial	Membrana plasmática		4	Ausente
A4HY61	Putative 40S ribosomal protein S13	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A4HXT8	Putative 60S ribosomal protein L10a	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4HYB7	4-coumarate:coa ligase-like protein	Metabolismo de Aminoácido	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A4HYN0	Putative calpain-like cysteine peptidase	Proteólise	Citoplasma	↑↑	0	Ausente
A4HY11	Peptidylprolyl isomerase	Proteólise/Fator de virulência	Citoplasma		0	Ausente
A4HXP7	Activator of Hsp90 ATPase - N-terminal/Activator of Hsp90 ATPase homolog 1-like protein - putative	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4HY15	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma		0	Ausente
A4HZT4	Putative proteasome regulatory ATPase subunit 1	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A4HZB2	Phosphotransferase	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma		0	Ausente
A4I0C0	Putative 3-ketoacyl-CoA thiolase	Metabolismo de Lipídeo	Mitocôndria		0	Ausente
A4I115	Transketolase	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4I116	GTP-binding nuclear protein	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma		0	Ausente
A4I1M5	Putative 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase	Outros metabolismos	Núcleo		2	Ausente
A4I1T4	Putative serine/threonine-protein kinase	Metabolismo de Aminoácido	Núcleo		0	Ausente
A4I041	Peroxidoxin	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A4HYD4	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4HZF7	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Secretada		1	Ausente
A4I1B7	Protein phosphatase 2C	PMT	Citoplasma		0	Ausente
A4I291	Putative thimet oligopeptidase	Outros metabolismos	Citoplasma	↑	0	Ausente

A4HZI3	Putative ATP synthase F1 subunit gamma protein	Metabolismo Energético	Citoplasma		0	Ausente
A4HZI9	Proteasome subunit alpha type	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A4I2C4	nucleolar protein , putative	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4I2T3	KH domain containing protein - putative	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4I1Z4	Putative 10 kDa heat shock protein	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria		0	Ausente
A4I253	Heat shock protein 70-related protein	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I154	Electron transfer flavoprotein subunit beta	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A4I3J9	Putative glucose-regulated protein 78	Resposta ao estresse oxidativo	Retículo endoplasmático		1	Presente
A4I2W3	Putative eukaryotic translation release factor	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4I3V1	Putative glycoprotein 96-92	Outros metabolismos	Núcleo	↑	0	Ausente
Q8WT30	Cysteine proteinase	Proteólise/Fator de virulência	Secretada		1	Presente
A4I4I8	Putative carnitine/choline acetyltransferase	Metabolismo de Lipídeo	Mitocôndria		0	Ausente
A4I4E4	Putative ADP ribosylation factor 3	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma		0	Ausente
E9AHE8	Putative small GTP-binding protein Rab1	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma		0	Ausente
A4I3X4	Vacuolar proton pump subunit B	Transporte de membrana /P-type ATPases	Citoplasma		0	Ausente
A4I4S9	Putative GTP-binding protein	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma		0	Ausente
A4I4X0	Putative serine/threonine-protein kinase	Metabolismo de Aminoácido	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I4U5	Enoyl-CoA hydratase/isomerase-like protein	PMT/ Metabolismo de Lipídeo	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A4I4A3	ADF/Cofilin	Citoesqueleto	Citoplasma		0	Ausente
E9AHH9	Putative ribosomal protein S20	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4I5T0	Putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria		0	Ausente
A4I651	Putative ATP synthase, epsilon chain	Metabolismo Energético	Mitocôndria		0	Ausente
A4I600	Putative 60S acidic ribosomal protein P2	Síntese de Proteína	Secretada	↑	0	Ausente
A4I3Y3	Putative acyl-CoA dehydrogenase	Metabolismo de Aminoácido	Mitocôndria		0	Ausente
A4I6N8	Putative N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	Metabolismo de Aminoácido	Citoplasma		0	Ausente
E9AHH1	Putative heat-shock protein hsp70	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4I6P8	H(+)-exporting diphosphatase	Transporte de membrana /P-type ATPases	Membrana plasmática		14	Presente
A4I426	Glutamate dehydrogenase	Metabolismo de Aminoácido	Citoplasma		0	Ausente
A4I1R2	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial	Metabolismo Carboidrato	Mitocôndria		0	Ausente
E9AHA1	Uncharacterized protein	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente

A4I4H3	Tryparedoxin_1_-_putative	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4I7K4	Probable eukaryotic initiation factor 4A	Síntese de Proteína	Núcleo	↑	0	Ausente
A4HYX4	Putative small myristoylated protein-1	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A4I6K4	Putative calpain-like cysteine peptidase	Proteólise	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I8C5	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Mitocôndria		0	Ausente
A4I8F6	Dihydrolipoyl dehydrogenase	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4I6N1	Biotin/lipoate protein ligase-like protein	PMT	Membrana plasmática		0	Ausente
A4I7Q4	60S ribosomal protein L18a	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A4I7Q0	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Mitocôndria		0	Ausente
E9AHR2	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4I993	Putative carboxypeptidase	Proteólise	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I048	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma		0	Ausente
A4IA34	Alba - putative	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A0A6L0XP11	Hypothetical_protein_-_conserved	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4I8P2	Thiol-dependent reductase 1	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria	↑	0	Ausente
E9AHM9	Heat shock protein 83-1	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4IA61	Regulatory subunit of protein kinase a-like protein	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4IAS5	60S ribosomal protein L30	Síntese de Proteína	Mitocôndria		0	Ausente
A4IAT7	Probable eukaryotic initiation factor 4A	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A0A6L0XQ48	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Proteólise/Fator de virulência	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A4I9W5	p25-alpha - putative	Citoesqueleto	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I8K8	Putative 60S ribosomal protein L2	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4IB24	Putative ubiquitin-conjugating enzyme e2	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A0A6L0XQB0	Arginase	Metabolismo de Aminoácido	Citoplasma	↑	0	Ausente
O44012	40S ribosomal protein S6	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
E9AHW1	Putative RNA-binding protein	Síntese de Proteína	Secretada		0	Ausente
A4IBQ9	Putative Gim5A protein	Transportador/Canal	Secretada		0	Ausente
A4I1P9	Putative 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	Metabolismo de Aminoácido	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I195	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4IAA4	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4IAD4	H(+)-transporting two-sector ATPase	Transportadores de Membrana/P-type ATPases				Ausente
A4I120	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase - putative	Metabolismo de Lipídeo	Mitocôndria		0	Ausente

A4IBY7	CS domain containing protein - putative	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4ICW8	Elongation factor 2	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4I1D2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Proteólise/Fator de virulência	Citoplasma		0	Ausente
A4IB12	Putative NADH-dependent fumarate reductase	Metabolismo Energético	Citoplasma	↑↑	0	Ausente
A4IBA6	Putative calcium motive P-type ATPase	Transportadores de Membrana/P-type ATPases		↑	0	Ausente
A4IDD0	Proteasome subunit alpha type	Transportadores de Membrana	Citoplasma		0	Ausente
A4IDG8	Phosphomannomutase	Metabolismo Carboidrato	Mitocôndria		0	Ausente
A4IDD4	Putative poly-zinc finger protein 2	Outros metabolismos	Secretada		0	Ausente
A4IDA9	14-3-3 protein-like protein	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I212	Glutathione peroxidase	Resposta ao estresse oxidativo	Secretada		0	Ausente
A4IBR5	Putative 60S ribosomal protein L27A/L29	Síntese de Proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente
A0A6L0XSA3	Ribosomal_protein_L3_-_putative	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4ID83	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	Metabolismo Carboidrato	Mitocôndria		0	Ausente
A4I2A3	Putative cytochrome c oxidase subunit V	Metabolismo Energético	Mitocôndria		0	Ausente
A4IB34	Threonine--tRNA ligase	Síntese de proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4IBY3	Putative mitochondrial phosphate transporter	Transportador Mitochondrial	Membrana plasmática		0	Ausente
A4IBX8	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Núcleo	↑	0	Ausente
A4IC21	Proteasome subunit alpha type	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
Q25298	Kinetoplastid membrane protein 11C	Citoesqueleto/Fator de virulência	Citoplasma		0	Ausente
A4I2N6	Putative calpain-like cysteine peptidase	Proteólise/Fator de virulência	Núcleo	↑	0	Ausente
A4IBR1	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4I341	Putative heat shock protein DNAJ	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4ICR0	zinc finger protein family member - putative	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4IDZ8	flagellum targeting protein kharon1 - putative	Citoesqueleto	Núcleo		0	Ausente
A4ID74	40S ribosomal protein S24	Síntese de Proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I3J0	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria		0	Ausente
E9AH15	Putative ribosomal protein L1a	Síntese de Proteína	Retículo endoplasmático		0	Ausente
A0A6L0XTS2	Transitional_endoplasmic_reticulum_ATPase_-_putative	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma		0	Ausente

A4I4V9	Putative heat shock protein 20	Resposta ao estresse oxidativo	Secretada		0	Ausente
A4HVI5	Putative 60S ribosomal protein L18	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4IDX6	Isoleucine--tRNA ligase	Síntese de proteína	Núcleo		0	Ausente
A4I4D9	Putative high mobility group protein homolog tdp-1	Síntese de proteína	Núcleo		0	Ausente
A4IDT2	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A0A6L0XUN7	Protein disulfide-isomerase	Resposta ao estresse oxidativo	Secretada	↑	1	Presente
A4IB31	Putative mitochondrial processing peptidase, beta subunit	Proteólise	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A4I4W0	Putative 60S ribosomal protein L13	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A4I6U1	Putative 3-ketoacyl-CoA thiolase-like protein	Metabolismo de Lipídeo	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A0A6L0XW33	Prostaglandin_f2-alpha_synthase/D-arabinose_dehyd rogenase	Fator de virulência	Citoplasma		0	Ausente
A4I784	ADP-ribosylation factor	Transporte mediado por vesícula	Mitocôndria		0	Ausente
A4IDB2	Putative translation elongation factor 1-beta	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4I708	Putative 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Metabolismo de Lipídeo	Mitocôndria		0	Ausente
A4I7R7	T-complex protein 1 subunit epsilon	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
E9AHQ7	Putative heat shock protein	Resposta ao estresse oxidativo	Núcleo	↑	0	Ausente
A4I946	Putative small GTP-binding protein Rab18	Transporte mediado por vesícula	Mitocôndria		0	Ausente
A4I9P1	Elongation factor 1-beta	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A0A6L0XZH3	Hypothetical_protein	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4IAU1	40S ribosomal protein S3a-2	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A4IAX3	Putative proteasome activator protein pa26	Proteólise	Citoplasma/Núcleo	↑	0	Ausente
A4IBE2	Galactokinase-like protein	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma		0	Ausente
A4IC14	Cyclophilin 40	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4IBL4	Putative cystathione gamma lyase	Metabolismo de Aminoácido	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4ICY0	Stress-inducible protein STI1 homolog	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4IBV3	Polyadenylate-binding protein	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4IDH5	Chaperonin HSP60, mitochondrial	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4IDH4	Chaperonin HSP60, mitochondrial	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4ID05	Adenosylhomocysteinase	Metabolismo de Poliamina	Citoplasma		0	Ausente
A4ICX9	Leucine carboxyl methyltransferase 1	PMT	Citoplasma		0	Ausente
A2CIQ7	Fumarate hydratase	Metabolismo Energético	Citoplasma		0	Ausente
Q9GNZ8	Proteasome subunit alpha type	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente

Q9N9V6	Eukaryotic translation initiation factor 5A	Síntese de Proteína	Citoplasma	0	Ausente
Q9N9V5	Putative 40S ribosomal protein S33	Síntese de Proteína	Citoplasma	0	Ausente
A4I9N9	Flagellar attachment zone protein 1	Citoesqueleto	Citoplasma/Núcleo	0	Ausente
A0A6L0XHS7	Heat_shock_protein_100_kDa	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria	0	Ausente
A4HRH1	beta eliminating lyase -putative	Metabolismo de aminoácido	Citoplasma	0	Ausente
A4HT33	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit h	Síntese de Proteína	Núcleo	0	Ausente
A4HTH1	Possible lysine decarboxylase - putative	Metabolismo de Lipídeo	Membrana plasmática	1	Ausente
A4HSN6	V-type proton ATPase subunit	Transporte de membrana	Citoplasma	0	Ausente
A4HUX0	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	Metabolismo de aminoácido	Citoplasma	0	Ausente
A0A6L0WLF7	Eukaryotic_initiation_factor_2a_-_putative	Síntese proteica	Citoplasma	0	Ausente
A4HS53	Putative spermidine synthase	Metabolismo Poliamina	Citoplasma	0	Ausente
A4HTJ0	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	Outros metabolismos	Núcleo	0	Ausente
A4HUY0	ATPase ASNA1 homolog	Transporte de membrana	Núcleo	0	Ausente
A4HVN4	NADH-cytochrome b5 reductase	Metabolismo Carboidrato	Retículo endoplasmático	1	Ausente
A0A6L0WRI0	Inositol-3-phosphate synthase	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma	0	Ausente
A4HS40	Adenylosuccinate lyase	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma	0	Ausente
A4HTE9	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit h	Síntese de Proteína	Citoplasma	0	Ausente
A4HU29	Putative eukaryotic translation initiation factor 2 subunit	Síntese de Proteína	Citoplasma	0	Ausente
A4HWJ3	Putative 40S ribosomal protein S3	Síntese de Proteína	Citoplasma	0	Ausente
A4HVK1	Ubiquitin-like protein	Proteólise	Núcleo	0	Ausente
A4HWA1	lysine decarboxylase-like protein	Metabolismo de aminoácido	Citoplasma	0	Ausente
E9AGL9	Cyclic nucleotide-binding domain containing protein - putative	Outros metabolismos	Núcleo	0	Ausente
A4HWN2	Proliferating cell nuclear antigen		Núcleo	0	Ausente
A0A6L0X797	Proline--tRNA ligase	Síntese de proteína	Citoplasma	0	Ausente
E9AGQ3	Putative elongation factor Tu	Síntese de Proteína	Mitocôndria	0	Ausente
A4HZI2	Putative centromere/microtubule binding protein cbf5	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma	0	Ausente

A4I1K7	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	Síntese de Proteína	Citoplasma	0	Ausente
A4HZQ8	Condensin complex subunit 1	Outros metabolismos	Núcleo	0	Ausente
A4I2M8	Ribokinase	Metabolismo Carboidrato	Secretada	0	Ausente
A4I309	D-lactate dehydrogenase-like protein	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma	0	Ausente
E9AHE6	Stress responsive A/B Barrel Domain - putative	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma	0	Ausente
A4HYZ4	Phosphatase-like protein	Citoesqueleto	Núcleo	0	Ausente
A4HY48	Kinesin-like protein	Citoesqueleto	Citoplasma	0	Ausente
A4I4E1	Guanine deaminase	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma	0	Ausente
A4I0M2	V-type proton ATPase subunit a	Transporte de membrana /P-type ATPases	Membrana plasmática	6	Ausente
A4I5F6	Pyridoxal kinase	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma/Núcleo	0	Ausente
A4I5L8	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	Metabolismo de Lipídeo	Mitocôndria	0	Ausente
A4I3H0	Archaic translocase outer mitochondrial membrane 46 kDa subunit - putative	Metabolismo Enegetico	Membrana plasmática	1	Ausente
A4I3S2	Putative X-pro, dipeptidyl-peptidase,serine peptidase,Clan SC, family S15	Proteólise	Mitocôndria	0	Ausente
A4I6Z6	ARM-like helical domain-containing protein		Citoplasma	0	Ausente
A4I7Y8	Coatomer subunit epsilon	Transporte mediado por vesícula	Secretada	0	Ausente
A4I8F2	T-complex protein 1 subunit alpha	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria	0	Ausente
A0A6L0XNV9	Asparagine--tRNA ligase	Síntese de proteína	Citoplasma	0	Ausente
A4IA37	RuvB-like helicase		Citoplasma	0	Ausente
A4I035	Uncharacterized protein	Citoesqueleto	mito_nucl	0	Ausente
A0A6L0XPK4	Hypothetical_protein_-_conserved	Outros metabolismos	Núcleo	0	Ausente
A4IAR5	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Mitocôndria	1	Ausente
A4I0A6	Kinesin-like protein	Citoesqueleto	Núcleo	0	Ausente
A4I0Y8	Putative IgE-dependent histamine-releasing factor		Citoplasma	0	Ausente
E9AHL7	Putative ADP-ribosylation factor	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma	0	Ausente
A4IBJ9	Glycerol kinase	Metabolismo de Lipídeo	Citoplasma	0	Ausente
A4I2Z3	Putative trypanothione synthetase	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria	0	Ausente
A4I904	Cysteine conjugate beta-lyase,aminotransferase-like protein	Metabolismo de aminoácido	Citoplasma/Núcleo	0	Ausente
E9AHQ2	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase	Metabolismo de Lipídeo	Mitocôndria	0	Ausente

A4ID12	Glycine--tRNA ligase	Síntese de proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4ID08	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4I4D1	Putative U-box domain protein	PMT	Núcleo		0	Ausente
A4I4T3	Aminopeptidase	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A4I5Z0	RNA-binding protein 42 (RNA-binding motif protein 42) - putative	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A4I602	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase	Metabolismo de Lipídeo	Mitocôndria		0	Presente
A4I7G8	protein transport protein SEC13 - putative	Transportador	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4IAE1	Serine palmitoyltransferase-like protein	Metabolismo de Lipídeo	Núcleo		0	Ausente
A4ICW2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A4IB55	Putative reiske iron-sulfur protein	Metabolismo Enetgético	Mitocôndria		1	Ausente
E9AHV6	short chain dehydrogenase - putative	Outros metabolismos	Membrana plasmática		1	Ausente
A4ICM4	Putative ribosomal protein L24	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A4IAN8	flagellar attachment zone protein 1	Citoesqueleto	Citoplasma		0	Ausente
A4IA46	RNA recognition motif. (a.k.a. RRM - RBD - or RNP domain)/RNA recognition motif (a.k.a. RRM - RBD - or RNP domain) - putative	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
A4HZ42	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4HY66	Putative nucleosome assembly protein		Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4I0H2	Coronin	Citoesqueleto	Mitocôndria		0	Ausente
A4HVX3	Proteasome subunit alpha type	Proteólise	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4I078	ATP-binding cassette protein subfamily G, member 5	Transportadores de Membrana/ABC transporter				Ausente
A0A381MCU2	40S ribosomal protein S4	Síntese de Proteína	Mitocôndria	↑↑	0	Ausente
A4HY23	Plasma membrane ATPase	Transportadores de Membrana/P-type ATPases				Ausente
A0A6L0XR19	Peptidase_m20/m25/m40_family-like_protein	Proteólise	Citoplasma	↑	0	Ausente
A0A6L0XSE5	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme_a_hydrolase-like_protein	Metabolismo de Lipídeo	Citoplasma		0	Ausente
A4IDS4	40S ribosomal protein SA	Síntese de Proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente
A0A6L0Y406	Glucose_transporter_2	Transportadores de Membrana	Membrana plasmática	↑↑	12	Ausente
A4HRU8	Succinate-acetate/proton symporter SatP	Transportadores de Membrana/proton antiporter	Membrana plasmática		5	Ausente

A4HSB6	Putative RNA-binding protein	Síntese de Proteína	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
E9AG68	Putative 60S ribosomal protein L23a	Síntese de Proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HSW5	Putative serine-threonine dehydratase	Metabolismo de Aminoácido	Membrana plasmática		0	Ausente
A4HS93	Putative adenylate kinase	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma		0	Ausente
A4HSL8	Dipeptidyl peptidase 3	Proteólise	Mitocôndria		0	Ausente
A4HTS8	calmodulin-like protein containing EF hand domain	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma		0	Ausente
A4HUC9	Putative nucleolar protein	Outros metabolismos	Citoplasma/Núcleo	↑	0	Ausente
A4HS36	Tetratricopeptide repeat - putative	Citoesqueleto	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HUC8	Putative mitogen-activated protein kinase	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4HT63	Putative cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	Metabolismo Energético	Núcleo		0	Ausente
A4HUK3	Putative small GTP-binding protein Rab11	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma		0	Ausente
A4HV47	Proteasome subunit beta	Proteólise	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
E9AGB0	Putative proteasome regulatory ATPase subunitcc118.3	Proteólise	Citoplasma	↑	0	Ausente
E9AG92	Dimethylargininase	Metabolismo de Aminoácido	Secretada	↑↑	0	Ausente
A4HTZ8	Prolyl endopeptidase	Proteólise	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HSQ3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Proteólise	Secretada		0	Presente
A4HTF3	Putative vesicle-associated membrane protein	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma		1	Ausente
A4HU23	Present in the outer mitochondrial membrane proteome 10 (POMP10)	Metabolismo Energético	Secretada	↑	1	Ausente
A4HVN8	Leucine--tRNA ligase	Síntese de proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HVS0	Ubiquitin-conjugating enzyme-like protein	PMT	Citoplasma/Núcleo	↑	0	Ausente
E9AGK2	Putative chaperonin TCP20	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4HS39	Putative calpain-like cysteine peptidase	Proteólise	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HVW1	AhpC/TSA family/Thioredoxin-like - putative	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4HVL5	Putative mitochondrial processing peptidase alpha subunit	Proteólise	Mitocôndria		0	Ausente
A0A6L0WQ54	Glutamine_synthetase_-_putative	Metabolismo de Aminoácido	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4HVV8	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4HVP7	Adenylosuccinate synthetase	Metabolismo de Aminoácido	Mitocôndria		0	Ausente
A4HRQ0	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4HRT4	Putative long chain fatty Acyl CoA synthetase	Metabolismo de Lipídeo	Citoplasma		0	Ausente

A4HS01	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4HSD9	Serine/threonine-protein phosphatase	PMT	Núcleo		0	Ausente
A4HTI0	Superoxide dismutase	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria		0	Ausente
A4HUB6	Dehydrogenase-like protein	Resposta ao estresse oxidativo	Membrana plasmática	↑	2	Ausente
A4HUM3	PAB1-binding protein - putative	Outros metabolismos	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4HUR9	GRIP domain-containing protein	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4HV24	Putative eukaryotic release factor 3	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
E9AGF4	Cytochrome c oxidase subunit IV	Metabolismo Energético	Mitocôndria		0	Ausente
A4HVL6	Uncharacterized protein	PMT	Núcleo		0	Ausente
A4HX02	Ubiquitin-fold modifier 1	PMT	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4HWD9	Putative 60S acidic ribosomal protein	Síntese de Proteína	Secretada		0	Presente
A4HX92	Cystathionine beta-synthase	Metabolismo de Aminoácido	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A4HWX3	Transaldolase	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma		0	Ausente
A4HWC4	Lysine--tRNA ligase	Síntese de proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HXG5	Putative META domain containing protein	Citoesqueleto	Citoesqueleto		0	Ausente
A4HXK6	Putative translation initiation factor	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4HXJ9	Histone H2B	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4HX65	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit a	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
E9AGR8	Putative aminopeptidase	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
E9AGR2	Putative fibrillarin	Metabolismo de Nucleotídeo	Núcleo		0	Ausente
A4HXY7	Putative ras-related protein rab-5	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma		0	Ausente
E9AGS6	4-coumarate:coa ligase-like protein	Metabolismo de Lipídeo	Membrana plasmática		0	Ausente
A0A6L0XA00	V-type proton ATPase subunit C	Transportadores de Membrana	Citoplasma		0	Ausente
A4HYY7	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4HXF5	GMP reductase	Metabolismo de nucleotídeo	Citoplasma		0	Ausente
A4HZL6	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4HYT9	Acireductone dioxygenase	Metabolismo de Aminoácido	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HZ54	Dihydroliipoamide acetyltransferaselike protein	Metabolismo Carboidrato	Núcleo		0	Ausente
A4HZM9	plectin - putative	Outros metabolismos	Núcleo		0	Ausente
A4HZD2	V-type proton ATPase subunit H	Metabolismo Energético	Citoesqueleto		0	Ausente
E9AGX7	T-complex protein 1 subunit delta	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria	↑	0	Ausente

A0A6L0XDP6	ATP-dependent_RNA_helicase_SUB2_- _putative	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4I013	Alanine--tRNA ligase	Síntese de proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HZP6	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4HZS1	Putative 40S ribosomal protein S15	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4I0F1	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A4I0K0	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	Metabolismo de Lipídeo	Mitocôndria	↑	0	Ausente
E9AH43	Fumarate hydratase	Metabolismo Energético	Mitocôndria		0	Ausente
A4HXQ3	Glycogen synthase kinase 3	Metabolismo Carboidrato	Membrana plasmática		0	Ausente
E9AH70	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Metabolismo Carboidrato	Mitocôndria		0	Ausente
A4HZT9	Putative proteasome regulatory ATPase subunit 5	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A4HZV5	Putative NADH-cytochrome b5 reductase	Metabolismo de Lipídeo	Secretada		0	Ausente
A4I116	40S ribosomal protein S8	Síntese de Proteína	Núcleo		0	Ausente
E9AH04	Farnesyl pyrophosphate synthase	Metabolismo de Lipídeo	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I005	I/6 autoantigen-like protein	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4I1F4	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	Metabolismo Carboidrato	Mitocôndria		0	Ausente
E9AHB0	Putative 60S ribosomal protein L7	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4I1V1	Adenine phosphoribosyltransferase	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma		0	Ausente
A4I045	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4I357	Putative proteasome alpha 7 subunit	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A4I2S2	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HZ53	Putative Ia RNA binding protein	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma		0	Ausente
A0A6L0XHZ4	Replication protein A subunit	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4I421	malate dehydrogenase, cytosolic	Metabolismo Carboidrato	Mitocôndria		1	Ausente
A4I3W2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4I3E3	Serine/threonine-protein phosphatase	PMT	Citoplasma		0	Ausente
A4I2C3	Putative mitotubule-associated protein Gb4	Citoesqueleto	Retículo endoplasmático		0	Ausente
A4I4E3	Uncharacterized protein	Metabolismo Energético	Mitocôndria		0	Ausente
A4I4I1	Hsp70 protein/TPR repeat/Tetratricopeptide repeat - putative	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma		0	Ausente
A4I2T4	Arginine--tRNA ligase	Síntese de proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente

A4I4I4	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100 (HSP100)	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A4I6I5	MORN repeat-containing protein 1	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4I608	Glutamate--tRNA ligase	Síntese de proteína	Mitocôndria	↑	0	Ausente
E9AGX3	Putative 60S ribosomal protein L9	Síntese de Proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I5C0	Adenosine kinase	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4I5G9	Putative N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	Metabolismo de Aminoácido	Mitocôndria		0	Ausente
A4I4Y5	RNA recognition motif. (a.k.a. RRM - RBD - or RNP domain)/RNA recognition motif (a.k.a. RRM - RBD - or RNP domain) - putative SAC3/GANP/Nin1/mts3/eIF-3 p25	Metabolismo de Nucleotídeo	Núcleo		0	Ausente
A4I841	family/COP9 signalosome - subunit CSN8 - putative	Transporte mediado por vesícula	Núcleo		0	Ausente
A4I2R2	Mitochondrial RNA binding protein 1	Metabolismo de Nucleotídeo	Secretada		0	Ausente
A4I6E4	Putative cytoskeleton-associated protein CAP5.5	Proteólise	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4I307	Protein unc-119 homolog	Outros metabolismos	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I8C8	Serine/threonine-protein phosphatase	PMT	Secretada	↑	0	Ausente
A4I8K5	Myosin XXI	Citoesqueleto	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4I9I0	Putative mitogen activated protein kinase	Outros metabolismos	Citoplasma	↑↑	0	Ausente
A4I933	Putative peptidase M20/M25/M40	Síntese de proteína	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HS42	60S ribosomal protein L11 (L5, L16)	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4I9C1	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Mitocôndria		0	Ausente
A4I484	TPR repeat/Tetratricopeptide repeat - putative	Citoesqueleto	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A2CIM6	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Metabolismo Carboidrato	Citoesqueleto		0	Ausente
A4I058	Putative endoribonuclease L-PSP (Pb5)	Outros metabolismos	Secretada	↑	0	Ausente
A4I0A5	Putative ubiquitin-activating enzyme e1	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A4I0B5	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Membrana plasmática		4	Presente
A0A6L0XPE1	Flagellar_attachment_zone_protein_-_putative	Citoesqueleto	Citoplasma		0	Ausente
A0A6L0XPE9	Malic enzyme	Metabolismo Carboidrato	Mitocôndria		0	Ausente
A4I8F1	Glucosamine-6-phosphate isomerase	Metabolismo de Aminoácido	Citoplasma		0	Ausente
A4I996	Putative aminopeptidase	Metabolismo de Aminoácido	Citoplasma		0	Ausente
A4I0H8	T-complex protein 1 subunit gamma	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4IAZ8	Putative casein kinase	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
Q2PD92	Aspartate aminotransferase	Metabolismo de Aminoácido	Citoplasma	↑↑	0	Ausente

E9AH20	Nucleoside 2-deoxyribosyltransferase - putative	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma/Núcleo	0	Ausente
A4IBK1	Probable eukaryotic initiation factor 4A	Síntese de Proteína	Núcleo	0	Ausente
A4IBC7	Putative aminopeptidase P	Proteólise	Citoplasma	0	Ausente
A4I1B3	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Núcleo	0	Ausente
A4I294	Proline dehydrogenase	Metabolismo de Aminoácido	Mitocôndria	0	Ausente
A0A6L0XRH3	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycotransferase	Outros metabolismos	Membrana plasmática	10	Presente
A4IB17	Putative short chain dehydrogenase	Outros metabolismos	Mitocôndria	0	Ausente
A4IDD3	Clathrin heavy chain	Outros metabolismos	Citoplasma	0	Ausente
A4I7P2	Putative RNA binding protein	Metabolismo de Nucleotídeo	Mitocôndria	0	Ausente
A4I2L1	Methylmalonyl-CoA mutase	Metabolismo de Aminoácido	Mitocôndria	0	Ausente
A4IB83	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Membrana plasmática	0	Ausente
A4I1Q0	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma	0	Ausente
A4I2P6	Putative 2-oxoglutarate dehydrogenase subunit	Metabolismo Carboidrato	Mitocôndria	0	Ausente
A4IBI6	Putative chaperone protein DNAj	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria	0	Ausente
A4IB16	Putative short chain dehydrogenase	Outros metabolismos	Citoplasma	0	Ausente
A4ID98	Putative ATP synthase	Metabolismo Energético	Citoplasma	0	Ausente
A4I2S6	T-complex protein 1 - beta subunit - putative	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma	0	Ausente
A4I2F5	Putative nitrilase	Resposta ao estresse oxidativo	Mitocôndria	0	Ausente
A4I650	40S ribosomal protein S14	Síntese de Proteína	Citoplasma	0	Ausente
A4I8X2	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Mitocôndria	1	Ausente
A4ICN7	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma	0	Ausente
A4IC84	Putative chaperone protein DNAj	Resposta ao estresse oxidativo	Núcleo	0	Ausente
A4ICB5	Prolyl endopeptidase	Proteólise	Mitocôndria	0	Ausente
A4I9H5	Putative ascorbate-dependent peroxidase	Resposta ao estresse oxidativo	Secretada	1	Ausente
A4ICD8	Putative eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8	Síntese de Proteína	Núcleo	0	Ausente
A4I9K5	Putative eukaryotic translation initiation factor 5	Síntese de Proteína	Citoplasma	0	Ausente
A4I397	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Metabolismo Carboidrato	Mitocôndria	1	Ausente
A4IE38	Proteasome regulatory ATPase subunit	Proteólise	Citoplasma	0	Ausente
A4IDT7	kinesin-like protein - putative	Citoesqueleto	Núcleo	0	Ausente

A4I574	Aspartate--tRNA ligase	Síntese de proteína	Citoplasma		0	Ausente
A0A6L0XUE2	Heat_shock_protein_90_-_putative	Resposta ao estresse oxidativo	Retículo endoplasmático		1	Presente
A4IBA7	Putative kinesin	Citoesqueleto	Mitocôndria		0	Ausente
A4I4S5	Rab GDP dissociation inhibitor	Transporte mediado por vesícula	Secretada		0	Ausente
A4I659	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4I512	Putative 2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	Metabolismo Carboidrato	Mitocôndria		0	Ausente
A4I565	Putative phosphatase 2C	PMT	Citoplasma		0	Ausente
A4ICB6	ATP synthase delta (OSCP) subunit - putative	Metabolismo Energético	Mitocôndria		0	Ausente
E9AHW9	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4I6M9	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Núcleo	↑	0	Ausente
A4ID50	Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring)	Metabolismo Carboidrato	Mitocôndria		0	Ausente
A4ID11	Snf7 - putative	Transporte mediado por vesícula	Núcleo		0	Ausente
A4I7C4	Putative serine/threonine-protein kinase A	PMT	Citoplasma		0	Ausente
A4I825	Putative ras-related protein rab-2a	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma		0	Ausente
A4I7L9	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Secretada		0	Ausente
A4I928	Ribulose-phosphate 3-epimerase	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4ICD2	T-complex protein 1 - theta subunit - putative	Resposta ao estresse oxidativo	Núcleo		0	Ausente
A4I9I0	Putative adenylate kinase	Metabolismo de Nucleotídeo	Citoplasma		0	Ausente
A4HWP9	Putative 60S ribosomal protein L13a	Síntese de Proteína	Núcleo	↑	0	Ausente
A4IB02	protein kinase - putative	Transporte mediado por vesícula	Citoplasma	↑↑	0	Ausente
A4IBE1	Putative acyl-CoA dehydrogenase	Metabolismo de Aminoácido	Mitocôndria		0	Ausente
A4ICN5	Putative 40S ribosomal protein S10	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4IC44	c-Myc-binding protein homolog	Outros metabolismos	Citoplasma/Núcleo		0	Ausente
A4IBF4	Fumarylacetoacetate (FAA) hydrolase family - putative	Metabolismo de Lipídeo	Mitocôndria	↑	0	Ausente
A4IBJ4	Putative ubiquitin-activating enzyme e1	Proteólise	Citoplasma		0	Ausente
A4IDL3	Methyltransferase	Outros metabolismos	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4IBS4	T-complex protein 1 - eta subunit - putative	Resposta ao estresse oxidativo	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4ID95	Fibrillarin	Metabolismo de Nucleotídeo	Núcleo	↑	0	Ausente
A4IDW0	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase - mitochondrial - putative	Resposta ao estresse oxidativo	Secretada	↑	0	Ausente

A2CII7	Mannose-6-phosphate isomerase	Metabolismo Carboidrato	Citoplasma		0	Ausente
A4HTC3	Putative nucleolar RNA-binding protein	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4HWM6	Putative nucleolar RNA binding protein	Metabolismo de Nucleotídeo	Mitocôndria		0	Ausente
Q9NJS2	Reticulon-like protein	Outros metabolismos	Membrana plasmática		3	Ausente
A4I6V2	Nucleosome assembly protein-like protein	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4HT92	Putative 40S ribosomal protein S9	Síntese de Proteína	Citoplasma		0	Ausente
A4HZ33	Putative mitochondrial processing peptidase alpha subunit	Proteólise	Mitocôndria		0	Ausente
A4I2W4	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma	↑	0	Ausente
A4HVV6	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma		0	Ausente
A4I5R1	Uncharacterized protein	Outros metabolismos	Citoplasma	↑↑	0	Ausente
A4IE04	Haloacid dehalogenase-like hydrolase - putative	Metabolismo de Aminoácido	Mitocôndria		0	Ausente

Distribuição das 494 proteínas únicas identificadas no proteoma total das seis cepas de *L. infantum* na forma amastigota isoladas dos cães Jack, Otto e Tchopo quando tratadas e não tratadas com miltefosina. Em azul está destacada a proteína (n=1) identificada na cepa MCAN/BR/2020/JACK_T0 tratado e não tratado com miltefosina. Em verde proteínas (n=4) exclusivamente identificadas nas cepas isoladas do cão Tchopo, em vermelho proteínas (n=70) exclusivamente identificadas nas cepas isoladas do cão Otto, em roxo (n=225) proteínas identificadas e compartilhadas entre as seis cepas isoladas dos três cães e em preto (n=194) proteínas que não foram compartilhadas entre pelo menos uma cepa nas diferentes condições experimentais. ID: número de identificação dos bancos de dados Uniprot/TritrypDB; TDM: Domínio transmembrana; PS: Peptídeo sinal; Grupos funcionais (Literatura): Tano et al. (2022); Pacakova et al. (2022); Biyani, Madhubala (2012), Ashrafmansouri, Amiri-Dashatan, Ahmadi (2022); Fialho-Junior et al. (2021); Pires et al. (2014), Lynn et al. (2013); Paape et al. (2010), Magalhães et al. (2014), Cotarzzo et al. (2022); Sanchiz et al. (2020); Jardim et al. (2018); Moreira et al. (2014); Tabashi et al. (2019). (GGG): Glicólise/Gliconeogênese/Glicosoma. (GGC): Glicólise/Gliconeogênese/Citosol. **Abundância aumentada:** isolados MCAN/BR/2020/JACK_T0 (↑) versus MCAN/BR/2020/JACK_T1 (↑); **Abundância aumentada:** isolados MCAN/BR/2020/TCHOPO_T0 (↑) versus MCAN/BR/2020/TCHOPO_T1(↑).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

ANEXO E – PUBLICAÇÕES REALIZADAS DURANTE O DOUTORADO

Lista S1- Artigos publicados em colaboração

DA ROSA R, **DAMBRÓS BP**, HÖEHR DE MORAES M, GRAND L, JACOLOT M, POPOWYCZ F, STEINDEL M, SCHENKEL EP, CAMPOS BERNARDES LS. Natural-product-inspired design and synthesis of two series of compounds active against *Trypanosoma cruzi*: Insights into structure-activity relationship, toxicity, and mechanism of action. *Bioorg Chem.* 2022 Feb; 119:105492. doi: 10.1016/j.bioorg.2021.105492. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34838333.

GUTERRES FERNANDES OL, TIZZIANI T, **DAMBRÓS BP**, FERREIRA DE SOUSA N, MANSUR PONTES CL, DA SILVA LAL, ESCORTEGANHA POLLO LA, DE ASSIS FF, SCOTTI MT, SCOTTI L, BRAGA AL, STEINDEL M, SANDJO LP. Studies of Cytotoxicity Effects, SARS-CoV-2 Main Protease Inhibition, and in Silico Interactions of Synthetic Chalcones. *Chem Biodivers.* 2023 Mar;20(3): e202201151. doi: 10.1002/cbdv.202201151. Epub 2023 Feb 14. PMID: 36740573.

LOUZADA-FLORES VN, LATROFA MS, LUCENTE MS, **DAMBRÓS BP**, MENDOZA-ROLDAN JA, VAROTTO-BOCCAZZI I, CATTANEO GM, SPÄTH GF, BUONAVOGLIA A, OTRANTO D. Intracellular persistence of *Leishmania tarentolae* in primary canine macrophage cells. *Acta Trop.* 2023 Apr 29:106935. doi: 10.1016/j.actatropica.2023.106935. Epub ahead of print. PMID: 37127215.