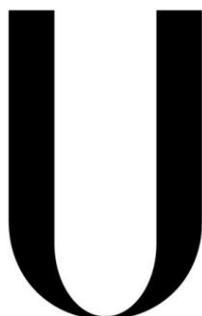


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



LISBOA

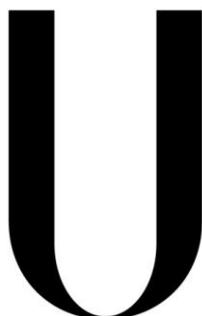
UNIVERSIDADE
DE LISBOA

A nitrosilação de proteínas em
Leishmania infantum

João Pedro da Costa Nunes
Dissertação
Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

A nitrosilação de proteínas em
Leishmania infantum

João Pedro da Costa Nunes

Dissertação

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica

Orientadores:

Doutora Marta Sousa Silva

Doutor Ricardo Gomes

2013

*“Logic will get you from A to B.
Imagination will take you everywhere!”*

Agradecimentos

Quero agradecer à Dra. Marta Sousa Silva por me ter orientado nesta tese de mestrado, por todos os ensinamentos, compreensão, paciência e por não me ter deixado desistir.

Quero também agradecer ao Dr. Ricardo Gomes por me ter orientado nesta tese de mestrado, por todos os ensinamentos dados na área de espectrometria de massa e por todas as suas ideias.

Ao professor Carlos Cordeiro, quero agradecer por todos ensinamentos prestados, tanto de espectrometria de massa como de parasitologia, pelo voto de confiança que me deu e por ter partilhado mil e uma histórias de vida, tornando-me uma pessoa mais culta.

Quero aqui deixar um agradecimento especial à professora Ana Ponces por me ter feito ver que a Bioquímica era o melhor futuro para mim.

Um enorme agradecimento aos restantes elementos do grupo de Enzimologia (Professor António Ferreira, Doutor Gonçalo Costa, Catarina, Rui, Kika, Marisa e Rita) por me aturarem dia após dia. Um agradecimento ainda mais especial àquela pessoa que passou 10 horas diárias trancada comigo no melhor laboratório do país. Raquel Mesquita, muito, muito, muito obrigado por tudo!

Quero também agradecer à Dra. Ana Tomás, líder do grupo de Parasitologia Molecular (IBMC, Universidade do Porto) pela cedência dos parasitas durante o desenvolvimento desta tese de mestrado.

Um obrigado aos grandes amigos que fiz na FCUL. Samuel Casaca, Mário Felício, Inês Marques, Luís Nobre, Rodrigo Bernarda e Bruno Boto, a faculdade sem vocês não era definitivamente a mesma coisa. Obrigado por estarem sempre comigo!

Um obrigado ainda a todas as pessoas que conheci na FCUL e que de alguma forma me ajudaram a crescer enquanto pessoa e cientista.

Quero agradecer aos meus irmãos abrantinos: Miguel Moedas, David Quinas e João Quinas. Adoro-vos!

Obviamente tenho ainda que agradecer à minha família por tudo o que têm feito por mim ao longo destes 24 anos de existência.

Por fim, agradeço à FCT pelo financiamento dos projectos que me permitiram realizar este trabalho (PTDC/SAU-MIC/115178/2009, PEst-OE/QUI/UI0612/2011 e PEst-OE/QUI/UI0612/2013).

Resumo

O parasita *Leishmania infantum*, endémico nos países mediterrânicos, incluindo Portugal, é o causador da leishmaniose visceral, uma doença letal se não for tratada e para a qual não existem vacinas humanas. Tendo um ciclo de vida complexo, estes parasitas regulam a expressão e a função de proteínas através de modificações pós-traducionais (PTMs), extremamente importantes no seu desenvolvimento e infecção, nomeadamente a S-nitrosilação.

Este trabalho teve dois objectivos principais. O primeiro foi a identificação do nitrosoproteoma da *Leishmania infantum*. Este objectivo foi conseguido utilizando duas abordagens proteómicas: a identificação por *peptide mass fingerprint* (PMF) por MALDI-FT-ICR e a análise por cromatografia líquida nano e espectrometria de massa (nanoLC-MS). O segundo objectivo foi a identificação dos processos metabólicos em que a nitrosilação pelo óxido nítrico poderá estar envolvida, de forma a perceber qual a importância desta modificação pós-traducional em *L. infantum*. No total foram identificadas 137 proteínas diferentes, 8 por MALDI-FT-ICR e 134 por nanoLC-MS. De salientar que apenas 3 proteínas identificadas por MALDI-FT-ICR não foram identificadas através de nanoLC-MS.

De entre os vários processos celulares identificados, que contêm proteínas nitrosiladas, podemos destacar como mais relevantes os processos de *protein folding*, a resposta ao stress e o metabolismo dos glúcidos. No que diz respeito ao *protein folding*, a S-nitrosilação das proteínas de choque térmico Hsp70 e Hsp83, bem como da proteína dissulfeto isomerase, poderá modelar a sua função como chaperone. Em relação à resposta ao stress, é interessante a S-nitrosilação da triparedoxina peroxidase e da glioxalase I, enzimas envolvidos no stress oxidativo e carbonílico, respectivamente. A modificação destas enzimas pelo NO poderá inibir a sua actividade enzimática. Por fim, em relação ao metabolismo de glúcidos, a S-nitrosilação da GAPDH poderá exercer um papel fundamental no controlo do fluxo glicolítico e a enolase poderá ter um papel importante no *scavange* do NO produzido pelo hospedeiro na fase de amastigota.

Palavras chave: Leishmaniose, *Leishmania infantum*, óxido nítrico, S-nitrosilação, Método de “Biotin-Switch”, Nitrosoproteoma

Abstract

The parasite *Leishmania infantum*, endemic from the Mediterranean region, including Portugal, it's the leading cause of visceral leishmaniasis, a lethal condition if untreated and for which there are no human vaccines. Due to their complex life cycle, these parasites use posttranslational modifications (PTM), e.i. S-nitrosylation, to regulate the expression and function of proteins being these extremely important in the parasite's development and infection capacity.

One of the two main objectives of this project was the *Leishmania infantum* nitrosoproteome identification. This objective was accomplished using two proteomic approaches: identification by peptide mass fingerprint (PMF) through MALDI-FTICR and analysis through nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC-MS). The second objective was the identification of the metabolic processes in which nitric oxide nitrosylation might be involved to allow us to understand more about the importance of this posttranslational modification in *L. infantum*. Totally we identified 137 different proteins, 8 through MALDI-FT-ICR and 134 through nanoLC-MS.

Among the celular processes identified as containing nitrosilated proteins, protein folding, stress response and carbohydrate metabolism are the most important ones. S-nitrosilation of heat shock proteins Hsp70 and Hsp83, as well as of disulfide isomerase may modelate chaperon function. Besides of that, it's interesting that S-nitrosilation of Tryparedoxin peroxidase and glyoxalase I, enzymes involved in oxidative and carbonylic stress, respectively, may inhibit theirs enzymatic activity. Lastly, the S-nitrosilation of GAPDH may be relevant in glycolytic flux control and enolase may be important in the scavange of NO.

Keywords: Leishmaniasis, *Leishmania infantum*, Nitric oxide, S-nitrosilation, "Biotin-Switch" Method, Nitrosoproteome.

Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	V
ÍNDICE	VII
GLOSSÁRIO	1
1. INTRODUÇÃO TEÓRICA	2
1.1 - GÉNERO <i>LEISHMANIA</i>	3
1.2 - TIPOS DE LEISHMANIOSE.....	4
1.3 – CICLO DE VIDA	5
1.4 - <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	6
1.5 - MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS.....	7
1.6 - O ÓXIDO NÍTRICO	7
1.6.1 – <i>S-nitrosilação de proteínas</i>	8
1.7 - OBJECTIVOS DO TRABALHO	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 - PREPARAÇÃO DE EXTRACTO PROTEICO DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	13
2.2 - INDUÇÃO DE NITROSILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	13
2.3 – PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS NITROSILADAS	14
2.4 - ELETROFORESE DESNATURANTE UNIDIMENSIONAL: SDS-PAGE	15
2.5 - WESTERN BLOTTING	15
2.6 - ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS BIOTINILADAS	16
2.6.1 – <i>Focagem isoelétrica: primeira dimensão da separação</i>	16
2.6.2 – <i>SDS-PAGE: segunda dimensão da separação</i>	17
2.7 - PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA ANÁLISE POR MALDI-FTICR.....	17
2.7.1 - <i>Hidrólise</i>	17
2.7.2 - <i>Aplicação dos digeridos na placa de MALDI</i>	18
2.7.3 - <i>Obtenção e análise dos espectros de massa</i>	18
2.8 – PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS BIOTINILADAS PARA ANÁLISE POR NANOLC-MS	19
2.8.1 - <i>Hidrólise</i>	19
2.8.2 - <i>Purificação dos péptidos e análise por nanoLC-MS</i>	19
2.7.3 - <i>Obtenção e análise dos cromatogramas de HPLC e dos espectros de massa</i>	19
3. RESULTADOS	21
3.1 - OPTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE NITROSILAÇÃO DE PROTEÍNAS EM <i>L. INFANTUM</i>	23
3.2 – IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS NITROSILADAS POR <i>PEPTIDE MASS FINGERPRINTING (PMF)</i>	25
3.3 – IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS NITROSILADAS POR NANOLC-MS.....	29
4. CONCLUSÃO	39
4.1 PERSPECTIVAS FUTURAS	42
5. BIBLIOGRAFIA	43
6. ANEXOS	51

Glossário

2D	Electroforese bidimensional
ACN	Acetonitrilo
APS	Persulfato de amónio
BH4	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina do soro fisiológico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno-diamina-tetraacético
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
FMN	Mononucleótido de flavina
FT-ICR	do inglês, <i>Fourier-transform ion cyclotron resonance</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GLO1	Glioxalase I
GLO2	Glioxalase II
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
HPDP-Biotina	N-[6-(biotinamido)hexyl]-3-(2-pyridyldithio) propionamide - Biotina
IEF	do inglês, <i>Isoelectric Focusing</i>
IPG	do inglês, <i>immobilized pH gradients</i>
MALDI	do inglês, <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MMS	S-metil metanotiosulfanato
MS	do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>
NADPH	Fosfato dinucleótido de adenina nicotinamida
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico Sintase
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
PTM	Modificação pós-traducional
SDS-PAGE	do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNAP	S-nitroso-n-acetil penicilamina
TBS	Tampão Tris salino
TEMED	O N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético

1. Introdução Teórica

1.1 - Género *Leishmania*

Leishmania é um género de parasitas protozoários da família dos tripanossomatídeos, causadores de doenças designadas por leishmanioses [1]. Existem actualmente 21 espécies de *Leishmania* com capacidade de infectar o Homem. A prevalência desta doença situa-se aproximadamente em 12 milhões de infectados, havendo uma mortalidade anual de 60.000 pessoas e o aparecimento de 2 milhões de novos casos por ano [2]. Esta doença é considerada endémica em 98 países [3] (Figura 1), estando 350 milhões de pessoas em risco de a contrair [2]. Na leishmaniose humana estima-se que por cada caso sintomático, existam 10 de infecção assintomática [4].

Nos últimos anos tem-se verificado a tendência para o aumento do número de casos associados com HIV (Figura 1) [5].

Estes parasitas têm como vector de transmissão insectos do género *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* (mosca da areia) [6]. As alterações climáticas, especialmente o aumento da temperatura e os invernos menos rigorosos podem contribuir para um aumento da actividade do vector e do número de meses de transmissão do parasita, aumentando assim a incidência da doença [7].

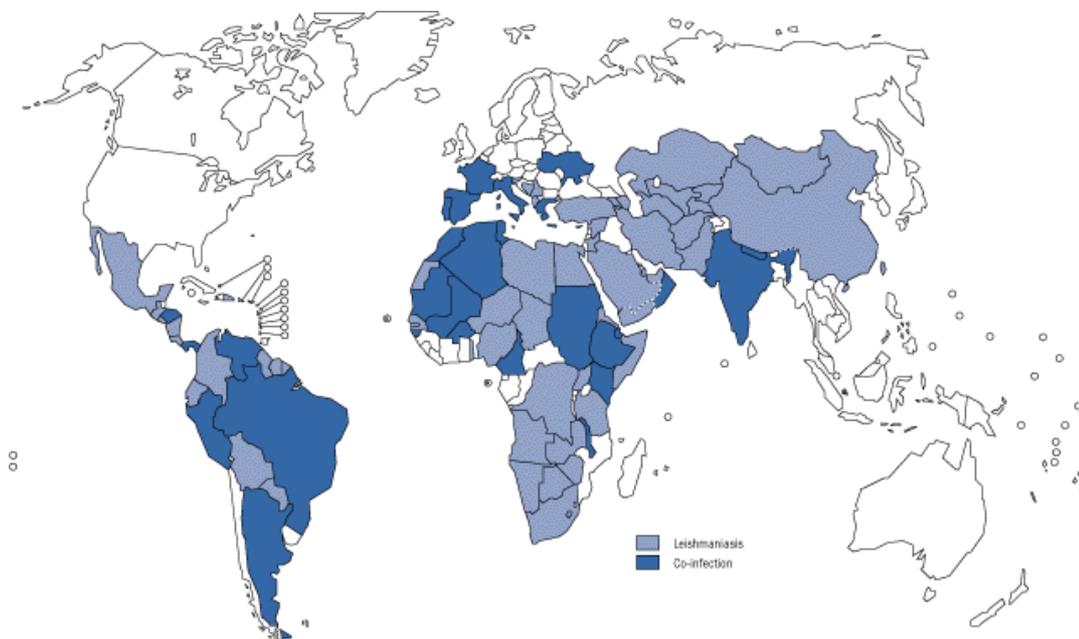


Figura 1: Distribuição da leishmaniose e da sua co-infecção com HIV a nível mundial [8]

1.2 - Tipos de leishmaniose

As manifestações clínicas da doença dependem da espécie de parasita e vão desde simples lesões cutâneas no local da picada até uma infecção visceral potencialmente fatal (tabela 1) [9].

A leishmaniose cutânea é a forma menos grave e a mais comum de todos os tipos de leishmaniose. É caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas no local da picada podendo levar ao aparecimento de úlceras, dependendo da espécie do parasita. As principais espécies causadoras são *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. major*, *L. tropica* e *L. amazonensis* [10].

A leishmaniose mucocutânea, a qual é uma variante da leishmaniose cutânea é caracterizada pela destruição total ou parcial das membranas das mucosas oral e nasal. Ao contrário da Leishmaniose cutânea, pode por em risco a vida do organismo infectado caso não seja tratado. As principais espécies causadoras são *L. braziliensis* e *L. amazonensis* [10].

A leishmaniose visceral é a mais letal das formas da doença, sendo quase sempre fatal se não tratada. Os sintomas deste tipo de leishmaniose vão desde febre elevada, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia [11]. As principais espécies causadoras são *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*.

Tabela 1: Espécies de *leishmania* e fenótipo da doença (adaptada de [9])

Tipo de Doença	Espécie de <i>Leishmania</i>
Leishmaniose Visceral	<i>L. donovani</i>
	<i>L. infantum</i>
	<i>L. chagasi</i>
	<i>L. amazonensis</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>L. major</i>
	<i>L. tropica</i>
	<i>L. amazonensis</i>
	<i>L. mexicana</i>
Leishmaniose Mucocutânea	<i>L. braziliensis</i>
	<i>L. guyanensis</i>
	<i>L. amazonensis</i>

As espécies de *Leishmania* causadoras do tipo de doença cutânea e visceral diferem uma da outra, sendo que as primeiras são menos sensíveis a choques térmicos [12], ou seja, aguentam uma maior variação de temperatura e são também mais resistentes a oxidantes como o óxido nítrico (NO) [13]. As diferenças genéticas entre espécies de parasita são a principal razão para que diferentes espécies sejam causadores de diferentes tipos de leishmanioses [9].

1.3 – Ciclo de vida

Estes parasitas possuem um ciclo de vida dimórfico, variando entre uma forma extracelular, flagelada e móvel no intestino da mosca da areia fêmea (promastigota) e uma forma intracelular não-móvel (amastigotas), residente dentro de vesículas fagolisossomais dos macrófagos de um mamífero hospedeiro (humanos, canídeos ou roedores) [14], (figura 2).

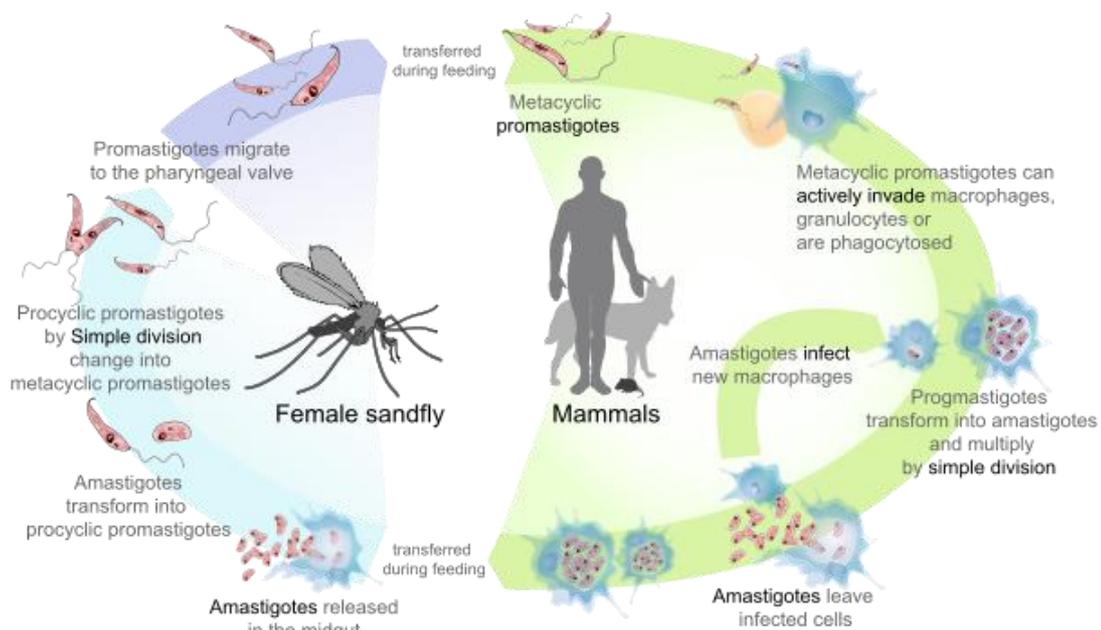


Figura 2: Ciclo de vida do parasita *Leishmania*. Quando a mosca da areia pica um mamífero, injecta os promastigotas metacíclicos no hospedeiro, os quais são fagocitados por macrófagos e diferenciam-se em amastigotas. Os macrófagos libertam depois os amastigotas, que infectam novos macrófagos. Quando uma outra mosca da areia pica o mesmo hospedeiro, ingere macrófagos infectados com amastigotas, os quais se diferenciam em promastigotas no tracto intestinal da mosca da areia, recomeçando assim o ciclo [15].

O parasita entra no organismo do hospedeiro através de uma picada de uma mosca da areia fêmea, sendo que neutrófilos, macrófagos e células dendríticas do hospedeiro são

recrutados para essa zona [16]. Na medida em que os neutrófilos têm um tempo de vida curto, acredita-se que sirvam como intermediários para entrar silenciosamente nos macrófagos ou células dendríticas num processo mediado por receptores [17]. Os macrófagos são as células hospedeiras finais para a proliferação do parasita. Depois de serem internalizados nos fagolisossomas dos macrófagos, os promastigotas vão sofrer processos de diferenciação, transformando-se em amastigotas, os quais se vão dividir múltiplas vezes por bipartição, e infectar novos macrófagos [14]. Quando uma outra mosca de areia pica o hospedeiro infectado, algumas células fagocitárias contendo amastigotas são removidas deste, os quais vão sofrer uma série de modificações morfológicas no intestino do vector, dando origem a promastigotas procíclicos. Este tipo de promastigotas possui a capacidade de se multiplicar, diferenciando-se em promastigotas metacíclicos, num processo denominado metaciclogénese. Nesta fase, os promastigotas adquirem a sua forma infecciosa e migram para a cavidade bucal da mosca [14] (Figura 2).

1.4 - *Leishmania infantum*

O parasita *Leishmania infantum*, endémico nos países da Europa mediterrânea, é a espécie causadora da leishmaniose visceral, a variante mais grave da leishmaniose [18], sendo o cão o principal hospedeiro e reservatório [19]. Pensa-se que todos os anos, 500.000 novas pessoas são infectadas por este tipo de leishmaniose, maioritariamente crianças e indivíduos infectados com HIV [20].

Ainda não existem vacinas humanas para esta doença, e as terapias utilizadas (à base de compostos antimoniais pentavalentes) são pouco eficazes. Por outro lado, os parasitas têm-se tornado resistentes aos fármacos, sendo por isso necessário desenvolver novas drogas, eficazes e com poucos efeitos secundários, acessíveis e resistentes a longo prazo [21].

No desenvolvimento de novas drogas e na identificação de novos alvos terapêuticos, é fundamental o conhecimento das características bioquímicas, metabólicas e fisiológicas únicas destes parasitas que os distinguem dos seus hospedeiros. No entanto, a abordagem de criar um inibidor que actue apenas num único enzima-alvo apresenta algumas limitações. Por um lado pode haver vias alternativas, e por outro, em geral, os efeitos quantitativos da acção de um inibidor são atenuados na rede metabólica. É importante olhar para os sistemas metabólicos do parasita como um todo e afectar várias vias ao mesmo tempo.

1.5 - Modificações pós-traducionais

As modificações pós-traducionais (PTM) são adições de determinados grupos a um ou mais resíduos de aminoácidos de uma proteína, podendo mudar as propriedades desta. As PTM desempenham um papel importante numa vasta gama de vias de sinalização tanto intercelular como intracelular.

As PTM estão divididas em dois grupos: modificações enzimáticas, como a fosforilação, acetilação e glicosilação, e não enzimáticas como a nitrosilação, uma modificação pós-traducional causada pelo óxido nítrico.

Na S-nitrosilação verifica-se a adição covalente de um grupo NO a uma cisteína livre. Proteínas que possuem este tipo de PTM participam num grande leque de processos biológicos incluindo tráfego celular, contracção muscular, apoptose, circulação e na regulação da função das proteínas [22].

1.6 - O Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa formada pela reacção da L-arginina com oxigénio molecular formando-se NO e citrulina, numa reacção catalisada pelo óxido nítrico sintase. São necessários vários cofactores para que a reacção ocorra: FMN (mononucleótido de flavina), FAD (dinucleótido de flavina e adenina), NADPH (fosfato dinucleótido de adenina nicotinamida) e BH₄ (tetrahydrobiopterina). Para além destes cofactores é necessário ainda a ligação da calmodulina ao enzima, sendo que também poderá ser necessário a presença de cálcio, dependendo da isoforma do enzima [23].

O NO está envolvido num grande número de processos biológicos, podendo actuar um mensageiro intracelular, como um neurotransmissor ou mesmo como hormona, assumindo uma enorme diversidade de funções de sinalização celular [24]. O NO desempenha ainda um papel crucial no sistema imunitário, tendo uma acção tumoricida e antimicrobiana, actuando como um agente tóxico para organismos infecciosos [24, 25]. Estudos revelam que o NO confere resistência à leishmaniose e ajuda na eliminação por apoptose de macrófagos contendo amastigotas [26].

Na medida em que o óxido nítrico é, por um lado um mensageiro celular, e por outro uma molécula importante do sistema de defesa do hospedeiro, é numa molécula chave no desenvolvimento do parasita e, possivelmente, no controlo da doença.

1.6.1 – S-nitrosilação de proteínas

A S-nitrosilação de proteínas é a adição covalente de um grupo NO a um resíduo de cisteína. Proteínas que possuem este tipo de PTM participam num grande leque de processos biológicos incluindo tráfego celular, contracção muscular, apoptose, circulação e na regulação da função das proteínas [27].

A S-nitrosilação de proteínas originada pelo óxido nítrico (NO) ocorre em resíduos de cisteína específicos e regula a função, actividade e estabilidade proteica, representando um mecanismo de regulação celular baseado em redox muito importante [27]. Comparativamente com a fosforilação, a S-nitrosilação proteica é uma via alternativa para a modulação proteica, regulada com precisão no tempo e espaço, através da qual as proteínas alvo podem actuar tanto como interruptores independentes quer como componentes de circuitos de sinalização muito mais complexas [28]. Algumas proteínas de vias metabólicas, de sinalização ou de relacionadas com o stress já foram identificadas como alvos do NO em vários tipos celulares.

A caracterização das proteínas S-nitrosiladas pode ser essencial para o entendimento da acção do NO em sistemas biológicos. Deste modo, muitas metodologias têm sido desenvolvidas para a detecção de tais proteínas. A detecção directa de proteínas S-nitrosiladas é preferível pois reflecte o ambiente *in vivo*. Contudo, devido à baixa massa, elevada labilidade e pouca abundância desta PTM, a sua detecção torna-se muito complicada. Tem-se desenvolvido várias abordagens de detecção indirecta de proteínas S-nitrosiladas, sendo a mais utilizada o método de Biotin-Switch, no qual a nitrosilação é substituída pela biotinição, podendo as proteínas serem identificadas espetrometria de massa [29].

1.7 - Objectivos do trabalho

O óxido nítrico é uma molécula essencial a todos os seres vivos e regula a actividade de inúmeras proteínas através da reacção com resíduos de cisteína, num processo denominado S-nitrosilação. Este trabalho tem dois objectivos principais. O primeiro é a identificação do nitrosoproteoma da *Leishmania infantum* através da utilização de duas abordagens proteómicas: identificação por *peptide mass fingerprint* (PMF) por MALDI-FTICR e a análise por cromatografia líquida nano e espectrometria de massa (nano-LC-MS). O

segundo objectivo é a identificação das vias e processos metabólicos em que a nitrosilação pelo óxido nítrico poderá estar envolvida, de forma a perceber qual a importância desta modificação pós-traducional em *L. infantum*.

2. Materiais e Métodos

2.1 - Preparação de extracto proteico de *Leishmania infantum*

Os parasitas em estadio de promastigota foram crescidos em meio SDM79 suplementado com 10% de soro fetal bovino (fornecidos pelo grupo de Parasitologia Molecular do IBMC).

Os extractos foram preparados em tampão HEN (250 mM HEPES pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM Neocuproina) com uma razão de 16 mL por mg de pellet, adicionando-se 40 µL de CHAPS 10% (m/v) por mL de sobrenadante. Para a lise das células, foi adicionado um volume de esferas de vidro (150-212 µm, SIGMA) igual ao volume de sobrenadante e realizaram-se 4 ciclos de agitação durante 1 minuto seguido de 1 minuto no gelo.

O extracto celular foi centrifugado 15 minutos a 10000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi recolhido.

O doseamento da concentração proteica foi feito utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay, segundo as indicações do fabricante.

2.2 - Indução de Nitrosilação de proteínas em *Leishmania infantum*

A S-nitrosilação de proteínas de *L. infantum* foi detectada utilizando o método de “Biotin-Switch” descrito por Jaffrey e Snyder [30]. Este método encontra-se esquematizado na figura 3.

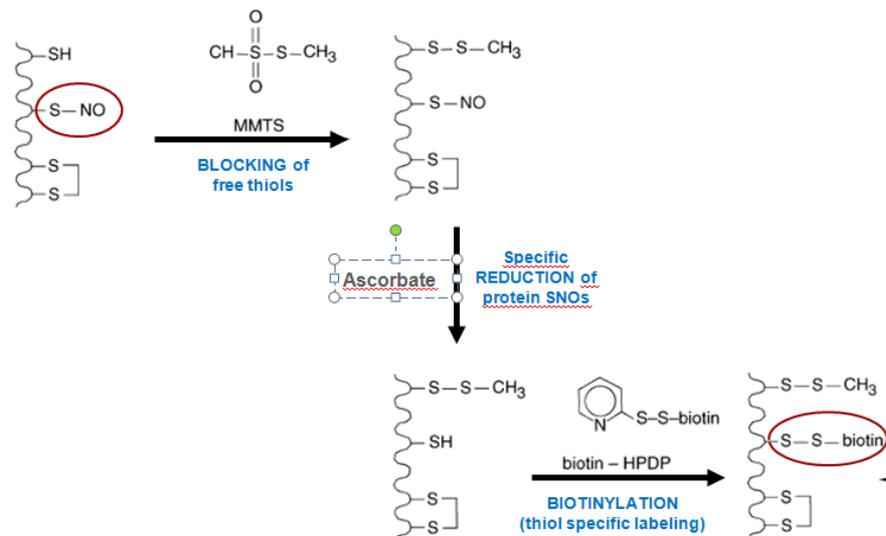


Figura 3- Esquema do método de Biotin-Switch.

Foram incubadas 120 µg de proteína, num volume total de 150 µL, com 250 µM de S-nitroso-n-acetil penicilamina (SNAP) durante 30 minutos no escuro, de forma a induzir a nitrosilação proteínas. Posteriormente foram adicionados 3 volumes de solução de bloqueio (9 volumes de HEN, 1 volume de SDS 25% (m/v) e 0,1 volumes de S-metil metanotiosulfonato (MMTS) e a solução foi incubada durante 1 hora a 50°C no escuro com vortex frequente. As proteínas foram depois precipitadas por incubação com 2 volumes de acetona fria durante 2 horas a -20°C. A amostra foi centrifugada 10 minutos a 8000 rpm a 4°C, sendo o sobrenadante posteriormente desprezado. O *pellet* foi ressuscitado com tampão HENS (HEN + 1% SDS). As cisteínas nitrosiladas foram posteriormente reduzidas pela adição de 5 mM de ascorbato e biotiniladas através da incubação com 1 mM de Biotina-HPDP durante 1 hora no escuro.

A concentração de SNAP foi otimizada, fazendo vários ensaios em que a concentração do indutor variou entre 0 e 250 µM. Igualmente, a concentração de ascorbato, o agente redutor das cisteínas nitrosiladas, também foi otimizada, fazendo variar a concentração entre 1,25 e 20 mM. Os controlos do ensaio de nitrosilação também foram realizados, nomeadamente a ausência de ascorbato, ausência de biotina HPDP, ausência de SNAP e ausência de MMTS.

2.3 – Purificação de proteínas nitrosiladas

Para a purificação das proteínas nitrosiladas, foram preparadas várias reacções (cada uma contendo 280 µg de proteína), seguindo-se o procedimento descrito anteriormente. No final, as proteínas foram precipitadas com 2 volumes de acetona fria (durante 16-18 horas), centrifugadas 15 minutos a 10000 rpm a 4°C e o *pellet* foi guardado. Os *pellets* foram ressuscitados com 80 µL de tampão HENS e foi adicionado 160 µL de tampão de neutralização (20 mM Hepes pH 7,7, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA). Foi adicionada à amostra 7 µL de resina (EZview Red Streptavidin Affinity Gel, Sigma), previamente equilibrada com 100 µL de tampão de neutralização, e foi incubada a 4°C durante 16 horas. O complexo foi centrifugado a 800 rpm durante 5 segundos e o sobrenadante foi recuperado (*Flow Through*) para posterior análise. Foram feitas 5 lavagens com 100 µL de 50 mM NH₄HCO₃, com centrifugação a 800 rpm durante 5 segundos e o sobrenadante foi recuperado (*1st Wash – 5th Wash*) para posterior análise.

Para subsequente realização de eletroforese bidimensional, a amostra foi incubada O/N com 2 volumes de acetona fria a -20°C. Para a análise da nitrosilação por eletroforese

desnaturante unidimensional (SDS-PAGE), e posteriormente por western blot, foi adicionado 20µL de SDS-PAGE loading buffer sem agentes redutores (62,5mM Tris-HCl pH6,8, 20% glicerol, 2% SDS, 0,01% azul bromofenol) e as amostras foram armazenadas a -20°C até a análise.

2.4 - Eletroforese desnaturante unidimensional: SDS-PAGE

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE num sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad). Os mini-géis (8,3 x 7,3 cm) de concentração e separação foram feitos com uma percentagem de poliacrilamida de 4% e 10%, respectivamente.

Após aplicadas as amostras e os marcadores de massa molecular de 250 a 10 kDa (5µL, Precision Plus Protein All Blue Standards, Bio-Rad), a electroforese foi efectuada em Tampão de Corrida Desnaturante (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS; pH ≈ 9), com uma fonte de alimentação. A separação foi realizada a uma diferença de potencial inicial de 80V, a qual se aumentou para 100 V a meio da corrida. A separação foi concluída quando o azul de bromofenol atingiu o fim do gel de resolução, tendo-se realizado posteriormente ou a sua coloração com Azul Coomassie ou a sua transferência através de Western Blot.

Para visualização das bandas contendo proteína, o gel foi corado com solução de Azul de Coomassie (40% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético glacial, 2% (m/v) Coomassie G-250 em água destilada), com agitação constante seguida de descoloração em Solução Descorante (40% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético glacial em água destilada) durante 1 hora e lavagens com água destilada.

2.5 - Western Blotting

Para a visualização das proteínas nitrosiladas, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE (como descrito anteriormente) e em seguida procedeu-se à sua transferência para uma membrana de PVDF (Immobilon-P IPVH00010, Millipore) previamente activada em metanol e equilibrada em tampão de transferência, usando o sistema Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad). Seguidamente, a membrana foi disposta junto ao gel e os dois são empacotados entre materiais absorventes, como esponjas e papel 3MM (seguindo as indicações do fabricante). A transferência das proteínas realizou-se em tampão de transferência (39mM glicina, 48mM Tris, 0,0375% SDS (m/v), 20% metanol (v/v)), durante 65 minutos a 100V.

A membrana foi bloqueada durante 16 horas com 5% de leite em pó em TBS-T (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,1% (v/v) Tween 20) a 4°C com agitação constante, sendo depois incubada durante 4 horas com anticorpo anti-biotina com uma diluição de 1:1000 com 5% de leite em pó em TBS-T. Para remover o excesso de anticorpo não ligado, fez-se 3 lavagens de 10 minutos com TBS-T.

Após incubação das membranas na solução de quimioluminescência (ECL Western blotting Substrate, Pierce) seguindo as instruções dos fabricantes, as membranas foram dispostas numa cassette de revelação (Hypercassette, Amersham Life Sciences) entre duas folhas de parafilme. A exposição dos filmes de revelação raios-X (BioMax Film, Kodak) à membrana variou conforme a intensidade luminosa do sinal. Os filmes foram revelados em solução de revelação (GBX, Kodak) e passados numa solução de fixação (GBX, Kodak).

2.6 - Eletroforese bidimensional de proteínas biotiniladas

2.6.1 – Focagem isoeétrica: primeira dimensão da separação

Após precipitação a -20°C (como foi referido anteriormente), duas amostras, contendo 120µg de proteína, foram centrifugadas durante 18 minutos a 13.600 rpm a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Os *pellets* foram resuspendidos com 125 µL (amostra 1) e 250 µL (amostra 2) de solução de rehidratação (8M Ureia, 2% (m/v) CHAPS, 0,0002% (v/v) Azul Bromofenol e 1% (v/v) IPG buffer pH 3-11 NL (GE Healthcare)), e foi incubado com agitação até o precipitado se encontrar solubilizado (aproximadamente 1 a 2 horas). Foram aplicados 125 µL das amostras nos sarcófagos e, sobre estas, foram colocadas as *strips* de gel da primeira dimensão (Immobiline DryStrip gel, GE Healthcare), com um gradiente de pH não linear (NL) entre 3 e 11. As amostras 1 e 2 foram utilizadas para coloração com nitrato de prata (contendo 120 ug de proteína) e para *western blot* (contendo 60 ug de proteína), respectivamente

Sobre as amostras nos sarcófagos foi adicionado 1 mL de PlusOne Dry Strip Cover Fluid (GE Healthcare) para impedir a desidratação da strip, a cristalização da ureia e otimizar a passagem de corrente durante a focagem.

Após a colocação dos sarcófagos no aparelho de focagem isoeétrica Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System (Amersham Biosciences), a primeira dimensão de separação foi realizada nas seguintes condições:

- 1) 12h – 30V
- 2) 100V – 150Vh
- 3) 250V – 250Vh
- 4) 1500V – 1500Vh
- 5) 2500V – 2500Vh
- 6) 8000V – 30' gradiente
- 7) 8000V – 12000 Vh

Depois da primeira dimensão terminar, as strips foram recolhidas para tubos de vidros, nos quais são guardadas a -20°C até se proceder à separação por SDS-PAGE.

2.6.2 – SDS-PAGE: segunda dimensão da separação

As strips foram incubadas com Solução de Equilíbrio (6M ureia, 75mM Tris-HCl pH 8,8, 30% (v/v) glicerol, 2% (v/v) SDS, 0.002% (v/v) Azul bromofenol) durante 30 minutos com agitação constante. Posteriormente, as strips foram aplicadas no topo dos géis SDS-PAGE com uma concentração de 10% de poliacrilamida, sendo cobertas por uma solução de agarose (0,5% (m/v), agarose e 0,002% (v/v) azul bromofenol em tampão de corrida). A separação foi realizada a 100 Volts até o azul de bromofenol sair do gel na totalidade. O gel que continha a amostra 1 foi corado com solução de nitrato de prata (Kit da GE, de acordo com as instruções do fabricante) e o gel que continha a solução foi analisado por Western Blot (como referido anteriormente).

O gel corado com prata foi utilizado para recolha dos spots das proteínas nitrosiladas, identificados por western blot.

2.7 - Preparação de proteínas para análise por MALDI-FTICR

2.7.1 - Hidrólise

As proteínas de *Leishmania* foram separadas por eletroforese bidimensional conforme descrito em secções anteriores. Após a coloração com solução de nitrato de prata, os *spots* de interesse foram retirados com o auxílio de uma ponta de 1mL cortada e foram

lavados 10 min com água mili-Q. Seguiram-se lavagens com 50 μ L de acetonitrilo a 50% (v/v) (até a solução de lavagem vir incolor), e desidratação com 50 μ L de acetonitrilo a 100% (v/v). As proteínas foram reduzidas com 50 μ L de 10 mM DTT em 100 mM de hidrogenocarbonato de amónio, durante 45 minutos a 56^o C com agitação. Seguidamente, as amostras foram alquiladas com 55 mM de iodocetamida em 100 mM de hidrogenocarbonato de amónio durante 30 minutos no escuro, para prevenir formação de ligações persulfureto. A iodocetamida foi removida, e as bandas de gel lavadas com 50 μ L de acetonitrilo a 50% (v/v), seguido de 50 μ L de acetonitrilo a 100% (v/v) e secaram ao ar. Para a digestão *in gel*, foram adicionados 30 μ L de 6,7 ng/ μ L de tripsina (*sequencing grade modified*, Promega) em 50 mM de hidrogenocarbonato de amónio a cada amostra a analisar, e incubadas 30 min em gelo. O excesso de solução não absorvida foi removido, e foram adicionados 30 μ L de 50 mM hidrogenocarbonato de amónio (sem tripsina). As amostras foram incubadas durante 16h a 37 $^{\circ}$ C. A solução contendo os péptidos a analisar foi removida e guardada a – 20 $^{\circ}$ C.

2.7.2 - Aplicação dos digeridos na placa de MALDI

Para análise por MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization), as soluções contendo os péptidos foram injectadas em microcolunas com resina R2 preparadas em gel loaders. Para tal, a ponta de uma gel loader foi fechada por achatamento. Foram colocados 20 μ L de acetonitrilo 100% (v/v) e uma pequena quantidade de resina R2 (suspensão em acetonitrilo). A mistura foi pressionada para fora da gel loader com o auxílio de uma seringa, foram colocados 20 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) a 2% (v/v) e as colunas preparadas foram guardadas no frigorífico até serem utilizadas. Para transferir as amostras para a placa de MALDI, foi retirado o TFA das gel loaders, as amostras foram acidificadas com 2 μ L de TFA a 2% (v/v), foi colocado 20 μ L da amostra na gel loader. Foi colocado 1 μ L de solução de matriz (5 mg/mL de ácido hidroxicinamico-4-ciano (Sigma) em 50% acetonitrilo (v/v) com 0,1% (v/v) TFA) e os péptidos foram eluídos directamente para a placa de MALDI AnchorChip (Bruker Daltonics, Bremen).

2.7.3 - Obtenção e análise dos espectros de massa

Os digeridos de proteínas foram analisados por MALDI-FT-ICR num espectrómetro de massa Bruker Apex Ultra Apollo II combi-source (Bruker Daltonics, Bremen) com um

magneto de 7 Tesla (MagneX Corporation, Oxford UK). As massas dos picos monoisotópicos dos péptidos foram determinadas pelo programa Data Analysis (versão 3.4), através do algoritmo SNAP 2 (Bruker Daltonics). Estas foram depois submetidas ao programa da identificação de proteínas Mascot (Matrix Science, London, UK) e analisadas com o software Biotoools 3.2 (Bruker Daltonics).

2.8 – Preparação de proteínas biotinizadas para análise por nanoLC-MS

2.8.1 - Hidrólise

Após a purificação das proteínas biotinizadas com a resina de streptavidina, como descrito anteriormente, foram adicionados 10 mM de ditioneitol (DTT) à resina para reduzir as proteínas, incubando a 56°C durante 45 minutos. De seguida, a alquilação foi realizada através da incubação com 55 mM de iodoacetamida (IAA) durante 30 minutos no escuro. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de 100 ng/µL de Tripsina e incubado durante 16 horas a 37°C.

2.8.2 - Purificação dos péptidos e análise por nanoLC-MS

Os péptidos resultantes foram purificados com resina R2 e R3 (suspensão em acetonitrilo, numa proporção de 1:1). Após eluição com acetonitrilo a 70% (v/v), os péptidos foram liofilizados e resuspendidos em 5µL de TFA a 0,1% (v/v), para serem analisados por nanoLC-MS num nanoEASYLC-LTQ Orbitrap XL (Thermo). A análise foi feita por Marta Sousa Silva no laboratório do Prof. Peter Roepstorff.

2.7.3 - Obtenção e análise dos cromatogramas de HPLC e dos espectros de massa

Os cromatogramas e espectros de massa foram recolhidos utilizando o software Xcalibur da Thermo, e as identificações foram obtidas pela análise dos espectros no software MaxQuant, utilizando o Andromeda como motor de busca.

3. Resultados

A nitrosilação de proteínas é uma importante modificação pós-traducional (PTM), investigada pela primeira vez neste trabalho em parasitas da família dos tripanosomatídeos. A S-nitrosilação é induzida pelo óxido nítrico (NO) e resulta de uma reacção reversível entre o NO e o grupo tiól de resíduos de cisteína. Desta forma, esta PTM é um dos mecanismos mais importantes da acção ubíqua do NO na sinalização celular e na regulação de processos redox fisiológicos [27]. Desta forma, o envolvimento do óxido nítrico na sinalização celular em tripanosomatídeos será igualmente importante, podendo modular a função e a actividade de proteínas.

De forma a identificar o nitrosoproteoma em *Leishmania infantum* foi utilizada o método de detecção do “biotin-switch”, seguindo-se duas abordagens proteómicas: identificação por *peptide mass fingerprint* (PMF) por MALDI-FTICR e a análise por cromatografia líquida nano e espectrometria de massa (nano-LC-MS), baseado em MS/MS.

3.1 - Optimização do protocolo de nitrosilação de proteínas em *L. infantum*

A primeira fase do trabalho consistiu em otimizar o protocolo de detecção de proteínas nitrosiladas. O método de “biotin-switch” é usado para o estudo de proteínas S-nitrosiladas. Este ensaio baseia-se na conversão de cisteínas nitrosiladas em cisteínas biotiniladas, prevenindo a perda do -SNO [30]. De forma resumida, os tióis livres (SH) são primeiramente bloqueados com S-Metil metanotiosulfanato (MMTS). Depois, os S-nitrosotióis (-SNO) são selectivamente reduzidos pelo ascorbato, permitindo assim a recção com a biotina-HPDP, um reagente de biotinilação específico de tióis. As proteínas S-nitrosiladas são confirmadas através da análise por imunoblot usando o anticorpo anti-biotina. Através da utilização deste procedimento, conseguimos detectar proteínas nitrosiladas em extractos proteicos de *Leishmania* (Figura 4).

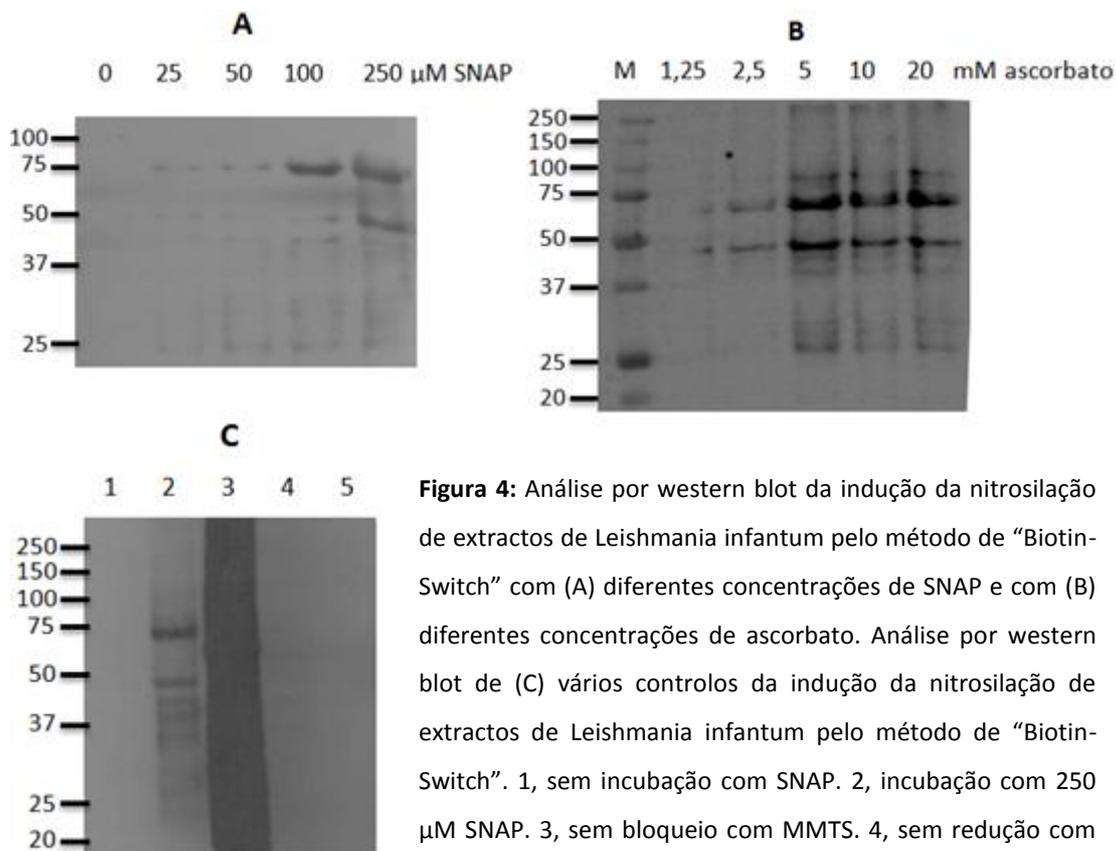


Figura 4: Análise por western blot da indução da nitrosilação de extractos de *Leishmania infantum* pelo método de “Biotin-Switch” com (A) diferentes concentrações de SNAP e com (B) diferentes concentrações de ascorbato. Análise por western blot de (C) vários controlos da indução da nitrosilação de extractos de *Leishmania infantum* pelo método de “Biotin-Switch”. 1, sem incubação com SNAP. 2, incubação com 250 μ M SNAP. 3, sem bloqueio com MMTS. 4, sem redução com ascorbato. 5, sem incubação com biotina.

A adição de SNAP tem como objectivo induzir a nitrosilação no extracto de *Leishmania infantum*. Realizou-se um ensaio com diferentes concentrações de SNAP (0 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 250 μ M) (Figura 4 A) de forma a averiguar qual a concentração que induz um maior sinal de nitrosilação nestes parasitas. Através da análise por western blot, observamos um sinal maior quando se utiliza 250 μ M de SNAP, tendo sido esta a concentração utilizada nas reacções subsequentes de nitrosilação. Para além disso, e visto que na literatura são descritas alterações ao método descrito por Jaffrey e Snyder relativamente à concentração de ascorbato utilizada na redução das cisteínas nitrosiladas (1,25 mM no método original), realizou-se um outro ensaio com diferentes concentrações de ascorbato (1,25 mM, 2,5 mM, 5mM, 10 mM e 20 mM), utilizando 250 μ M de SNAP (figura 4 B). Verificou-se que o sinal é muito menor para a concentração do método original de Jaffrey e Snyder, e que a partir de 5 mM de ascorbato o sinal mantém-se constante. Assim, a concentração de 5 mM foi utilizada nas reacções subsequentes.

Realizaram-se ainda vários controlos da reacção (com e sem indutor, sem o agente de bloqueio MMTS, sem ascorbato e sem biotina) (Figura 4 C). Ao analisar o resultado do

western blot obtido, observamos que praticamente não há marcação na lane 1 em que o extracto não foi incubado com SNAP. Tal pode ser explicado pelo facto da nitrosilação basal ser muito baixa e por ser uma PTM extremamente lábil, a qual se quebra facilmente na presença de luz. Quando se induz a nitrosilação do extracto (lane 2), verificamos o aparecimento de bandas, que correspondem a proteínas S-nitrosiladas. É de salientar que, para uma cisteína ser nitrosilada, é necessário existir um motivo de sequência específico ([KRHDE]-C-[DE] ou [GSTCYNQ]-[KRHDE]-C-[DE]). As cisteínas não nitrosiladas são bloqueadas com MMTS com o objectivo de a redução com ascorbato e a biotinição se procedam somente nas cisteínas nitrosiladas. Desta forma, na ausência de MMTS (lane 3), todas as proteínas com cisteínas livres vão ficar biotiniladas e, quando reagem com o anticorpo α -biotina, vão apresentar marcação intensa no imunoblot. Por outro lado, quando o extracto não é reduzido pelo ascorbato (lane 4), as ligações das cisteínas ao NO não vão ser quebradas, não havendo a posterior ligação da biotina e, desta forma, não irá haver marcação. De relembrar, porém, que a S-nitrosilação é uma ligação lábil, podendo haver casos em haja marcação no western blot mesmo sem a redução com ascorbato. Por fim, quando não se adiciona biotina (lane 5), não vai haver marcação, pois não vai haver biotinição das cisteínas, e conseqüentemente não ocorre reação com o anticorpo. Estes controlos mostraram-nos que o método de “Biotin-Switch” funciona bem com o extracto de *Leishmania*.

3.2 – Identificação das proteínas nitrosiladas por *peptide mass fingerprinting* (PMF)

Para identificar o nitrosoproteoma do parasita *Leishmania infantum* a primeira abordagem utilizada foi a técnica de *peptide mass fingerprinting* (PMF), após separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D) e detecção das proteínas nitrosiladas por *western blot*. A técnica de 2D é uma ferramenta eficaz e amplamente utilizada para a análise de misturas proteicas complexas extraídas de tecidos, células ou outras amostras biológicas. Permite separar as proteínas de acordo com duas propriedades físicas independentes em 2 passos independentes. Num primeiro passo (focagem isoeléctrica) as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoeléctrico (pI) e, num segundo passo (electroforese SDS-PAGE), são separadas de acordo com a sua massa molecular.

Na 1ª dimensão do 2D foram analisadas 2 amostras de extracto de *Leishmania infantum* com diferentes quantidades de proteína, 120 μ g e 60 μ g de proteína, para coloração com

nitrate de prata e para *western blot*, respectivamente. Após uma corrida de 23 horas e 38 minutos, realizou-se a 2ª dimensão do 2D, tendo-se posteriormente corado com soluções de prata (figura 5A) o gel contendo 120 µg de proteína e fez-se um western blot do gel que continha 60 µg de proteína (figura 5B).

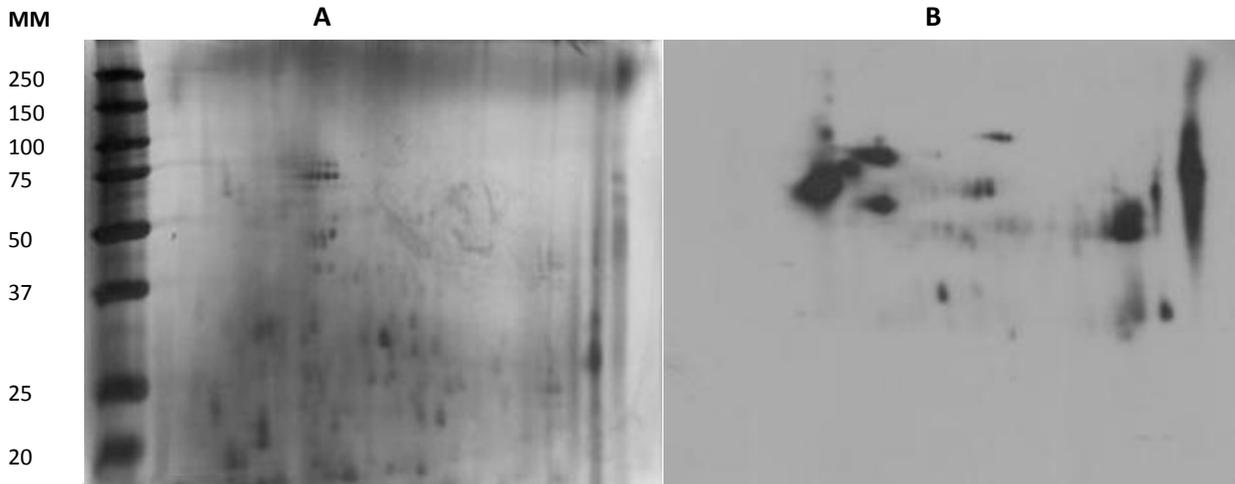


Figura 5: (A) Gel de eletroforese bidimensional de extracto de *Leishmania infantum* ao qual foi induzida a nitrosilação segundo o protocolo de Biotin-Switch. (B) análise por Western Blot de extracto de *Leishmania infantum* após indução de nitrosilação.

A partir da sobreposição do gel corado com soluções de nitrato de prata com o western, marcaram-se os *spots* comuns (figura 6).

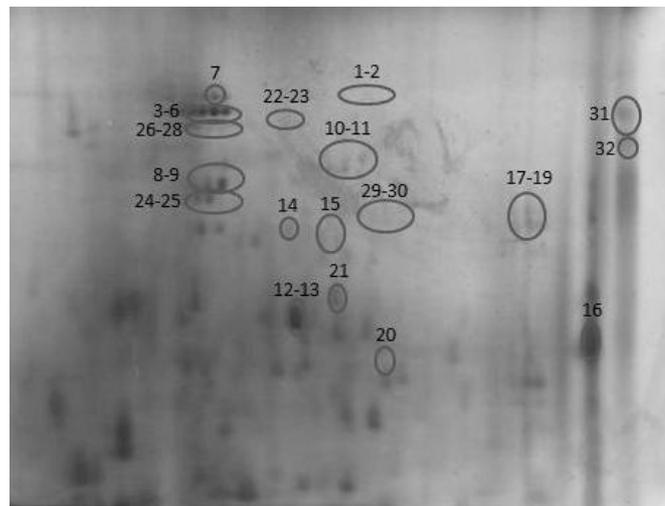


Figura 6: Gel de eletroforese bidimensional de extracto de *Leishmania infantum* ao qual foi induzida a nitrosilação segundo o protocolo de Biotin-Switch. Os *spots* assinalados foram extraídos para identificação por espectrometria de massa.

Desta forma foram marcados 32 *spots*, os quais foram excisados manualmente para digestão *in gel* utilizando tripsina. Os péptidos obtidos foram analisados por MALDI-FT-ICR

(exemplo de um espectro apresentado na figura 7), e submetidos à ferramenta MASCOT para identificação da proteína, tendo por base o padrão de péptidos obtidos após hidrólise da mesma.

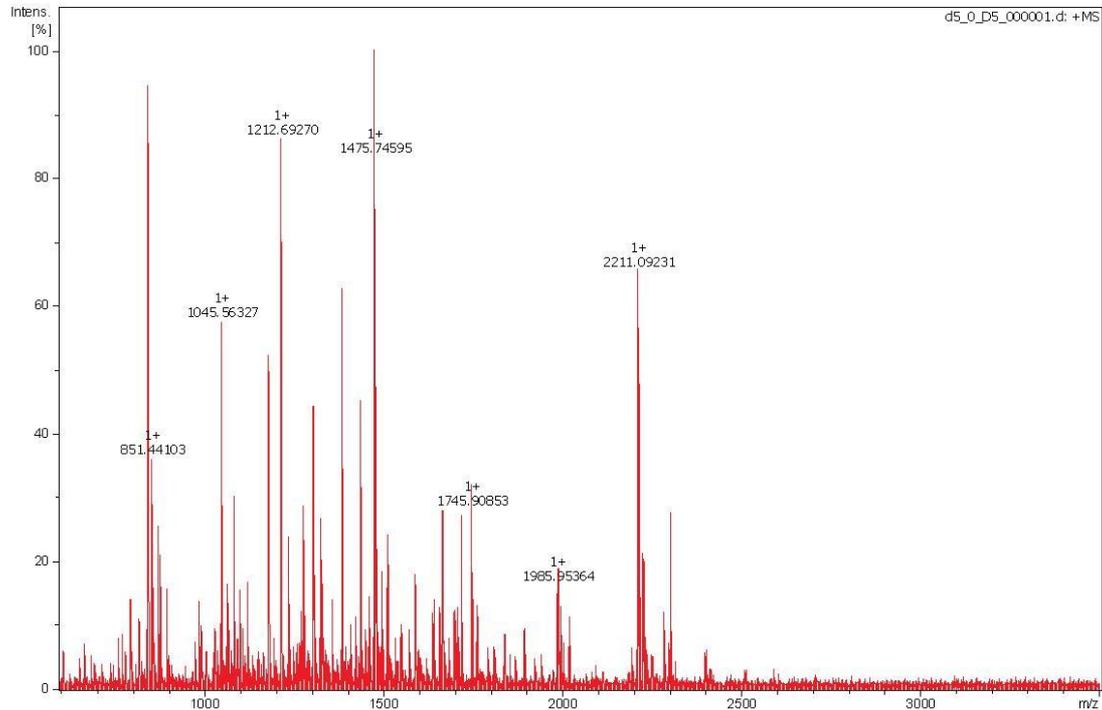


Figura 7: Espectro da análise de PMF por MALDI-FT-ICR de um *spot* após digestão com tripsina.

Dos 32 *spots* hidrolisados, foram identificadas 13 proteínas, algumas das quais em mais do que um *spot* e 19 não obtiveram identificação. As proteínas identificadas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Identificação por espectrometria de massa das proteínas nos spots dos géis 2D

Número do Spot	Nome da Proteína	Código de acesso da Uniprot	Código de acesso da GeneDB	MS Data		Possível localização celular	Processo Biológico GO	Função
				Mascot score	Matched MS peptides			
3	putative heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor	A4I5S4	LinJ.30.2470	133	16	Mitocôndrio	<i>Folding</i> proteico, ATP binding	<i>Folding</i> proteico e regulação / estabilização
5				95	10			
6				34	8			
8	Enolase	A4HW62	LinJ.14.1240	172	19	Citosol, Glicossoma	Glicólise	Metabolismo
9				106	11			
12	Factor de alongação 2	A4ICW8	LinJ.36.0190	89	11	Núcleo, Citosol	Tradução, Biossíntese Proteica	Biossíntese Proteica
13			LinJ.36.0200 LinJ.36.0210	99	10			
14	aldose 1-epimerase	A4I082	LinJ.23.0470	64	11	Citosol	Glicólise	Metabolismo
16	factor de alongação 1-alfa	A4HX73	LinJ.17.0090 LinJ.17.0100	33	11	Núcleo, Citosol	Tradução, Biossíntese Proteica	Biossíntese Proteica
19			LinJ.17.0170 LinJ.17.0190 LinJ.17.0200	50	14			
21	prostaglandina f2-alfa sintase/D-arabinose desidrogenase	A4I6Z4	LinJ.31.2210	192	16	Citosol	Oxidoredução	Metabolismo
25	Proteína dissulfito isomerase	A4ICD5	LinJ.36.7280	67	7	Citosol, reticulo endoplasmático	Cell redox homeostase, processos metabólicos	Cell redox homeostasis
28	Proteína de choque térmico 83-1	Q25293	LinJ.33.0350	42	18	Citosol	<i>Folding</i> proteico	<i>Folding</i> proteico e regulação / estabilização

Algumas proteínas essenciais em *Leishmania* foram identificadas como sendo nitrosiláveis (tabela 2), a maioria delas envolvida no *folding* proteico (as proteínas de choque térmico Hsp70 e Hsp83 e a proteína dissulfito isomerase), em alguns processos metabólicos (incluindo a aldose 1-epimerase, a prostaglandina f2-alfa sintase/D-arabinose desidrogenase e o enolase) e na biossíntese proteica (factor de alongação 1-alfa e factor de alongação 2). Algumas destas proteínas são importantes para a infecção e diferenciação do parasita, tais como as Hsp70 e Hsp83, as quais são expressas constitutivamente em *Leishmania* para garantir que o parasita reponde rapidamente a mudanças de temperatura [31]. Um dado bastante interessante é o facto da proteína Hsp70 e o enolase, perante uma exposição a um dador de NO, se encontrarem sobre-expressas em promastigotas de *L. infantum* [32].

Por outro lado, a proteína dissulfito isomerase catalisa a formação e a quebra das pontes persulfureto entre proteínas. Esta proteína foi identificada como transportadora de NO, facilitando a entrada de NO na célula via *S*-nitrosilação/de-nitrosilação [33]. A *S*-nitrosilação desta proteína foi ainda reportada como sendo importante fisiologicamente para a manutenção da integridade do endotélio [34].

Os factores de alongação, os quais facilitam a alongação translacional na síntese proteica, foram também identificados como alvos da S-nitrosilação, o que pode sugerir que o NO pode desempenhar um papel importante da regulação da maquinaria de síntese proteica [35].

Na IEF a migração de duas amostras iguais, apesar de semelhante, nunca ocorre de forma igual. Deste modo, e na medida em que os spots foram escolhidos com base na sobreposição de um gel corado com soluções de prata e de um western, o match pode não ter sido totalmente correcto, podendo haver o aparecimento de falsos positivos, ou seja, proteínas que se encontram presentes no parasita, mas os quais não estavam nitrosilados.

3.3 – Identificação das proteínas nitrosiladas por NanoLc-Ms

A segunda abordagem proteómica utilizada para identificar o nitrosoproteoma em *Leishmania infantum* foi a análise por nanoLC-MS. Esta técnica combina as capacidades de separação física do HPLC com as capacidades de análise de massa da espectrometria de massa.

Para a realização desta técnica, começou-se por purificar as proteínas biotinizadas através da adição da resina de streptavidina, seguindo-se as reacções de redução, alquilação e hidrólise directamente com as beads. Depois de um passo de purificação com resina R2 e R3, os péptidos foram analisados por nanoLC-MS, estando o cromatograma obtido e um espectro de massa representativo, expostos na figura 8 e 9, respectivamente.

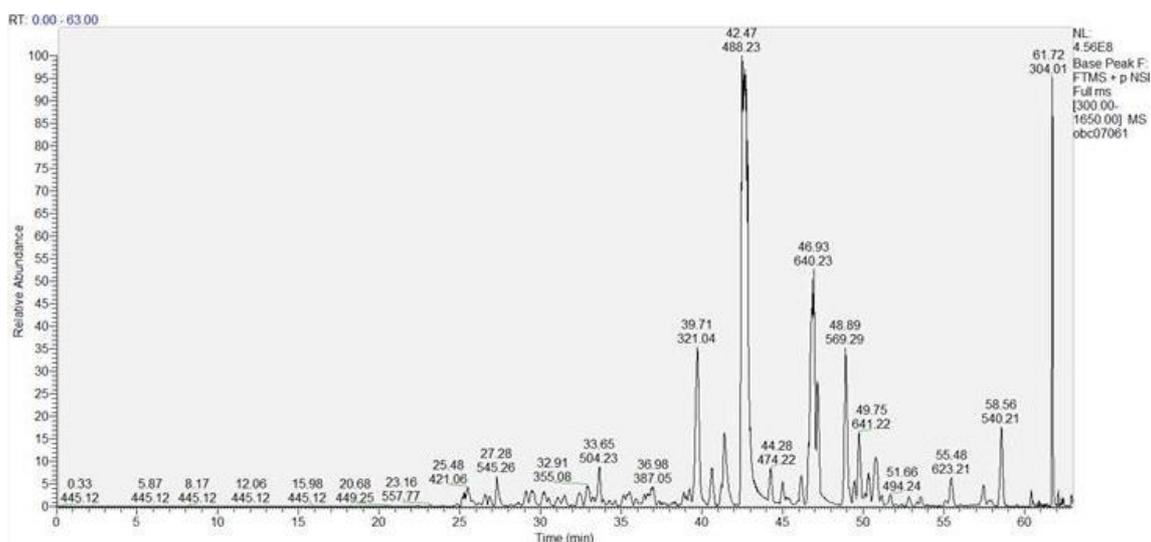


Figura 8: Cromatograma do extracto biotinizado e purificado de *Leishmania infantum* obtido a partir de nanoLC.

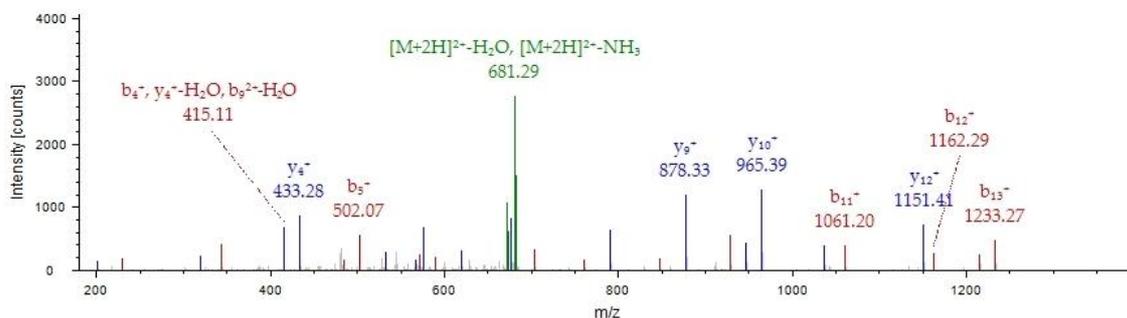


Figura 9: Espectro da análise de MS/MS por nanoLC-MS de uma proteína não caracterizada (UniProtID A4HZQ8).

A partir dos espectros de massa obtidos, e recorrendo ao software MaxQuant foram identificadas 225 proteínas: 93 diferentes, anotadas ou caracterizadas no proteoma de *Leishmania*, mais 41 não caracterizadas ou de função desconhecida. As proteínas identificadas estão descritas na tabela A4 em anexo. Através da análise dos resultados obtidos por esta abordagem, verificamos de imediato um grande aumento do número de proteínas identificadas quando comparado com a abordagem por 2D-MALDI-FTICR. De 13 proteínas identificadas em MALDI, conseguimos 225 em nanoLC-MS, sendo que algumas destas identificações foram obtidas em ambas as técnicas, nomeadamente as proteínas de choque térmico Hsp70 e Hsp83, o enolase e os factores de alongação 1 e 2 (ver tabelas 2 e 3).

Tabela 3 – Nome, função/processo biológico e localização celular das proteínas S-nitrosiladas identificadas por nanoLC-MS (versão resumida da tabela em anexo)

UniProt ID	Nomes das proteínas	Função / processo biológico	Localização celular
A4HRK0	Provável fator de iniciação eucariota 4A	Tradução	Citosol
A4HRL2	Proteína não caracterizada	-	-
A4HRY4	Factor de alongação 2, subunidade alfa, Putativa	Tradução	Citosol
A4HSG0	Proteína associada a microtubulos, putative	Regulação do citoesqueleto	Citoesqueleto
A4HSH2	ATP sintase, subunide alfa	Metabolismo Energético	Mitocôndrio
A4HSW6	Proteína não caracterizada	-	-
A4HT02	Proteína não caracterizada	-	-
A4HTP4	HOP	Proteína de resposta ao stress / Folding Proteico	Citosol / Núcleo
A4I8U5	Beta-tubulina	Regulação do citoesqueleto	Citosol
A4HU13	Calmodulina, Putativa	Sinalização (Ligação ao cálcio) / NO synthesis	Citosol / Núcleo / Mitocôndrio
Q9BHZ6	Factor de alongação-1 gama	Tradução	Citosol

A nitrosilação de proteínas em *Leishmania infantum*

A4HVX3	Subunidade alfa do proteossoma	Folding Proteico / Degradação Proteica	Núcleo / Citosol
A4HV47	Subunidade beta do proteossoma	Folding Proteico / Degradação Proteica	Núcleo / Citosol
A4HVG8	Proteína não caracterizada	Ligação aos ácidos nucleicos	Núcleo
A4HVQ2	Proteína não caracterizada	Metabolismo Energético	Citosol
A4HVV8	Proteína não caracterizada	-	-
A4HW09	faty acid elongase	Metabolismo de ácidos gordos	Região Perinuclear
A4HW62	Enolase	Metabolismo de glúcidos	Citosol
Q8MU50	Proteína antioxidante específica do tiol	Resposta ao stress	Citosol
Q95NF5	Peroxiredoxina citosol (Triparedoxina peroxidase)	Resposta ao stress	Citosol
A4HWK2	Triparedoxina peroxidase	Resposta ao stress	Citosol
E9AGP7	Factor de elongação 1-alfa	Tradução	Citosol
A4HXY3	cAMP fosfodiesterase A	Sinalização	Citosol
A4HY43	Proteína transportadora de ADP/ATP, mitocondrial	Transporte / Metabolismo Energético	Mitocôndrio
A4HY71	Proteína não caracterizada	-	-
A4HYV5	DNAj-like protein	Folding Proteico / Regulação de genes	Citosol
A4HYX1	calpain-like cysteine peptidase, Putativa	Sinalização (Ligação do cálcio) / Degradação Proteica / Regulação do citoesqueleto	Citosol / Parasitophorous vacuole / lisosoma
A4I2N7	calpain-like cysteine peptidase	Sinalização (Ligação do cálcio) / Degradação Proteica / Regulação do citoesqueleto	Citosol / Parasitophorous vacuole / lisosoma
Q8WT30	peptidase da cisteína C (família C1)	Degradação Proteica	lisosoma / Flagellar pocket
A4HYX2	Proteína não caracterizada (Putativa nucleosome assembly protein)	Regulação de genes	Núcleo
A4HZ42	Proteína não caracterizada (Nuclear Transporte factor 2 domain)	Regulação de genes	Núcleo
A4HZ53	Putativa la RNA binding protein	Regulação de genes	Núcleo
A4HZE0	Putativa 2-oxoisovalerato desidrogenase subunidade alfa	Metabolismo de glúcidos / Metabolismo de aminoácidos	Mitocôndrio
A4HZF7	Proteína não caracterizada	-	-
A4HZI2	Putativa centromere/microtubule binding protein cbf5	Tradução	Núcleo
E9AGQ8	Proteína Ribossomal 40S S2	Tradução	Ribossoma
Q9N9V4	Proteína Ribossomal 40S S25	Tradução	Ribossoma
A4IAU1	Proteína Ribossomal 40S S3a-2	Tradução	Ribossoma
A4IAU0	Proteína Ribossomal 40S S3a-1	Tradução	Ribossoma
A4HZI4	Proteína Ribossomal 40S S6	Tradução	Ribossoma
A4IDS4	Proteína Ribossomal 40S SA	Tradução	Ribossoma
A4I011	Proteína Ribossomal 40S L14, Putativa	Tradução	Ribossoma
A4ICN5	Proteína Ribossomal 40S S10, Putativa	Tradução	Ribossoma
A4HY61	Proteína Ribossomal 40S S13, Putativa	Tradução	Ribossoma
A4HV26	Proteína Ribossomal 40S S15A, Putativa	Tradução	Ribossoma
A4HUY6	Proteína Ribossomal 40S S21, Putativa	Tradução	Ribossoma
A4HWJ3	Proteína Ribossomal 40S S3, Putativa	Tradução	Ribossoma
A4HVQ0	Proteína Ribossomal 40S S4, Putativa	Tradução	Ribossoma
A4HS42	Proteína Ribossomal 60S L11	Tradução	Ribossoma
A4IC63	Proteína Ribossomal 60S L37	Tradução	Ribossoma
P62886 / E9AHN8	Proteína Ribossomal 60S L13 ,Putativa	Tradução	Ribossoma
A4I4W0	Proteína Ribossomal 60S L17 ,Putativa	Tradução	Ribossoma

A4I0M7	Proteína Ribossomal 60S L18 ,Putativa	Tradução	Ribossoma
A4HVI5	Proteína Ribossomal 60S L21 ,Putativa	Tradução	Ribossoma
A4ID69	Proteína Ribossomal 60S L22 ,Putativa	Tradução	Ribossoma
A4IDM1	Proteína Ribossomal 60S L35 ,Putativa	Tradução	Ribossoma
A4I114	Proteína Ribossomal 60S L26 ,Putativa	Tradução	Ribossoma
E9AHI5	Proteína Ribossomal putativaL1a	Tradução	Ribossoma
A4I4G7	Proteína Ribossomal putativaL27	Tradução	Ribossoma
A4I8D8	Proteína Ribossomal putativaL3	Tradução	Ribossoma
A4I8D7	Proteína Ribossomal putativaS26	Tradução	Ribossoma
A4I3C8	Proteína Ribossomal putativaS7	Tradução	Ribossoma
A4HRG4	Proteína RibossomalL15	Tradução	Ribossoma
Q9N9V8	Putativa small nuclear ribonucleoprotein	Regulação de genes	Núcleo
A4I7S4	Proteína não caracterizada	-	-
A4HZQ8	Putativa (H+)-ATPase G subunidade	Metabolismo Energético	Mitocôndrio
A4I074	Putativa factor de tradução sui1	Tradução	Citosol
A4I191	Proteína de ligação ao RNA, Putativa, UPB2	Regulação de genes	Citosol / Núcleo
E9AH94	Putativa Proteína de ligação ao RNA	Regulação de genes	Citosol / Núcleo
A4I2Y0	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	Folding Proteico	Citosol
A4I1D2	Dehydrogenase-like protein	Metabolismo de glúcidos	Citosol
A4I1E4	Putativa GTP-binding protein (GTP-binding nuclear protein Ran)	Sinalização	Citosol / Núcleo
A4I1I6	Putativa GTP-binding protein (Dynamin 1-like protein)	Endocitose	Citosol
A4I4S9	Proteína não caracterizada (Putativa Rab GTPase activator)	Sinalização / Regulação do citoesqueleto	Citosol
A4I1J5	Proteína não caracterizada (JAB ubiquitin protease family motif)	Folding Proteico	Citosol
A4I1K7	Piruvato desidrogenase E1 subunidade beta, Putativa	Metabolismo de glúcidos	Mitocôndrio
A4I1L9	Putativa 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	Metabolismo de glúcidos	Citosol
A4I1P9	Dihydroliipoamide acetyltransferaselike protein	Metabolismo de glúcidos	Mitocôndrio
A4I3X3	2-oxoglutarato desidrogenase, componente E2, Putativa	Metabolismo de glúcidos	Mitocôndrio
A4I2P6	Proteína não caracterizada	-	-
A4I2N0	Proteína de ligação ao RNA 1, mitocondrial	Regulação de genes	Mitocôndrio
A4I2R2	Proteína não caracterizada (Putativa ATP-dependent RNA helicase)	Regulação de genes	Citosol
A4I7K4	Putativa ATP-dependente RNA helicase	Regulação de genes / Tradução	Citosol / Ribossoma
A4IBK1	Factor de iniciação eIF-4E, Putativa	Tradução	Citosol
A4I2V4	Proteína não caracterizada	-	-
A4I2X9	Fosfoenolpiruvato carboxicinase glicosomal, Putativa	Metabolismo de glúcidos	Glicossoma
A4I2Y7	Proteína não caracterizada (Intraflagellar Transporte protein 43 motif)	Regulação do citoesqueleto	Flagelo
A4I303	Putativa Proteína de choque térmico DNAJ	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol
A4I341	Putativa 10 kDa Proteína de choque térmico	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol
A4I1Z4	Proteína de choque térmico 70-related protein	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol
A4I253	Putativa proteína de choque térmico hsp70	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol
Q25292	proteína de choque térmico 70	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol
I3VJX3	70 kDa Proteína de choque térmico	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol
A4I5S9	Putativa related proteína de choque térmico 70, mitocondrial	Folding Proteico / Resposta ao stress	Mitocôndrio

A nitrosilação de proteínas em *Leishmania infantum*

A4I5S4	Proteína não caracterizada	-	-
A4I480	ADF/Cofilina	Regulação do citoesqueleto	Citosol
A4I4A3	Putativa serina/threonine-proteína cinase	Sinalização	Citosol
A4I4X0	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, glicosomal	Metabolismo de glúcidos / Resposta ao stress	Glicossoma
A4I5X6	Putativa surface protein amastin	Interação com o patogénio hospedeiro	Membrana (superfície celular)
A4I5B8	Proteína não caracterizada	-	-
A4I504	Proteína não caracterizada	-	-
A4I584	Proteína não caracterizada	-	-
A4I950	Proteína não caracterizada	-	-
A4I9C1	Proteína não caracterizada	-	-
A4I5J6	Proteína não caracterizada (Metal-binding motif)	-	Citosol
A4I6A1	Proteína não caracterizada	-	-
A4I6M9	Proteína não caracterizada	-	-
A4I7G5	Proteína não caracterizada (Putativa HSP70 motif)	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol
A4I4I1	Proteína não caracterizada (Putativa RNA recognition motif)	Regulação de genes	Núcleo / Citosol
A4I7Q0	Putativa fenilalanil-tRNA sintetase cadeia alfa	Tradução	Citosol
A4I7Q3	Superoxido dismutase (SODB1, Fe-Mn family)	Resposta ao stress	Glicossoma
A4I7Z7	Superoxido dismutase (SODB2, Fe-Mn family)	Resposta ao stress	Glicossoma
A4I7Z8	Proteína não caracterizada	-	-
A4I860	Proteína não caracterizada (Putativa LYR motif)	-	Mitocôndrio
A4I883	Proteína Putativa de ligação ao RNA	Tradução	Ribossoma
A4I8A2	Dihidrolipoil desidrogenase	Resposta ao stress	Citosol
A4I8F6	Putative ubiquitin-conjugating enzyme e2	Degradação Proteica	Citosol / Núcleo
A4I9P7	Putativa uracilo fosforibosiltransferase	Metabolismo de pirimidina	Citosol
A4I9Q8	Proteína não caracterizada (Putativa RNA binding motif)	Regulação de genes	-
A4IA34	Regulatory subunit of protein kinase a-like protein	Sinalização	Citosol
A4IA61	Proteína não caracterizada (Putativa Transcription factor Pcc1 motif)	Regulação de genes	-
A4IAL9	Proteína não caracterizada (Putativa Epimerase motif)	Metabolismo de glúcidos	Citosol
A4IAN1	Piruvato cinase	Metabolismo de glúcidos	Citosol
A4IAQ1	Proteína não caracterizada	-	-
A4IAW4	Proteína não caracterizada (Putativa protein serine/threonine kinase)	Sinalização	Citosol
A4IB02	Kinetoplastid membrane protein 11C	Regulação do citoesqueleto / Resposta defensiva	Citosol
Q25298	Kinetoplastid membrane protein 11B	Regulação do citoesqueleto / Resposta defensiva	Citosol
Q25297	Kinetoplastid membrane protein-11	Regulação do citoesqueleto / Resposta defensiva	Citosol
G1AQL5	Kinetoplastid membrane protein 11-1	Regulação do citoesqueleto / Resposta defensiva	Citosol
A4IBB3	Kinetoplastid membrane protein 11-2	Regulação do citoesqueleto / Resposta defensiva	Citosol
A4IBB2	Glioxalase I	Metabolismo de glúcidos / Resposta ao stress	Citosol
Q2PYM9	Proteína não caracterizada (Putativa Proteína de ligação ao RNA PNO1)	Regulação de genes	Núcleo
A4IBP5	Proteína não caracterizada	-	-
A4ICD7	Putativa eukaryotic Traduçãofactor de iniciação 3 subunit 8	Tradução	Citosol
A4ICD8	Putativa Transitional Reticulo Endoplasmático ATPase	Degradação Proteica	Reticulo Endoplasmático
A4ICJ9	Putativa N-acetyltransferase subunit Nat1	?	?

A4ICK2	Frutose-bisfosfato aldolase	Metabolismo de glúcidos	Citosol
A4ICK8	Factor de elongação 2	Tradução	Citosol
A4ICW8	Adenosilhomocisteinase	Metabolismo de aminoácidos	-
A4ID05	Universal minicircle sequence binding protein	-	-
A4IDD2	Putativa universal minicircle sequence binding protein	-	-
A4IDD1	Putativa poly-zinc finger protein 2	-	-
A4IDD4	Putativa universal minicircle sequence binding protein	-	-
A4IDD5	Proteína não caracterizada	-	-
A4IDK1	Proteína não caracterizada	-	-
A4IDP5	Proteína não caracterizada	-	-
A4IDT2	Proteína não caracterizada	-	-
E9AGK7	Alfa tubulina	Regulação do citoesqueleto	Citosol
A4HVG1	Putativa ATP-dependent RNA helicase	Tradução	Ribossoma
E9AGQ0	Fatty acid Transporter protein-like protein	Metabolismo de ácidos gordos	-
E9AH85	Proteína não caracterizada	-	-
E9AHD5	Proteína não caracterizada	-	-
E9AH11	Proteína de choque térmico 83-1	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol
E9AHM8	Succinil-CoA:3-cetoacido-coenzima A transferase	Metabolismo de aminoácidos	Mitocôndrio
E9AHM9	Proteína de choque térmico, Putativa	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol
Q25293	Aspartato aminotransferase	Metabolismo de aminoácidos	-
E9AHQ2	Subunidade alfa do proteossoma	<i>Folding, sorting e degradação</i>	Núcleo / Citosol
E9AHQ7	Difosfate cinase Nucleosido	Metabolismo de nucleótidos	-
Q2PD92	<i>22 kDa potentially aggravating protein papLe22</i>	-	Reticulo Endoplasmático
Q8WT33	Histona H2A	Regulação de genes	Núcleo
Q8WT32	Histona H2A.1	Regulação de genes	Núcleo
E9AGW1	Histona H2A.2	Regulação de genes	Núcleo
E9AGW0	Histona H2B	Regulação de genes	Núcleo
A4HY42	Histona 3	Regulação de genes	Núcleo
O02612	Histona H3	Regulação de genes	Núcleo
A4HUL0	Histona H3, Putative	Regulação de genes	Núcleo
A4IB25	Histona H4	Regulação de genes	Núcleo

De forma a tentar perceber em quais processos biológicos a nitrosilação pelo óxido nítrico poderá estar envolvida, as proteínas foram agrupadas segundo a sua função (figura 10). Verificou-se que um grande número destas proteínas se encontra envolvida em processos de *folding* proteico (17,9%), resposta ao stress (13,6%), tradução (11,4%), metabolismo, nomeadamente de carboidratos (7,1%) e existem 13,9% de proteínas com função desconhecida. O NO parece afectar muitas proteínas de diversas vias metabólicas e processos celulares, no entanto, só vamos analisar algumas delas.

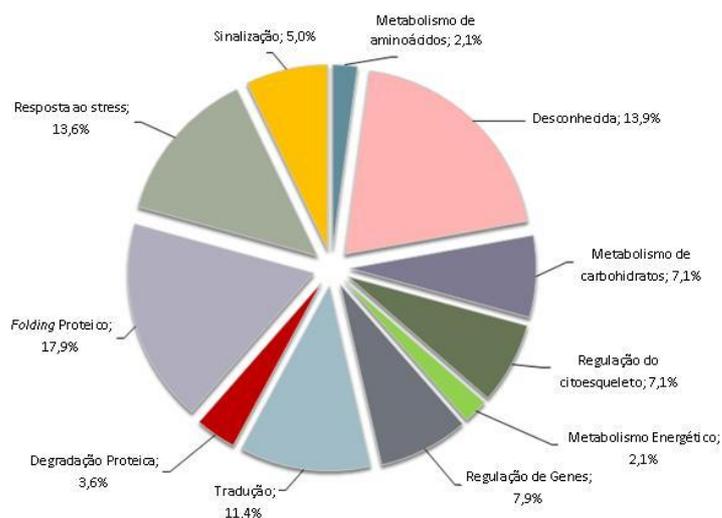


Figura 10: Representação esquemática dos processos biológicos associados às proteínas nitrosiladas identificadas por NanoLC-MS.

De todos processos celulares identificados, que contêm proteínas nitrosiladas, os mais relevantes são sem dúvida os processos de folding proteico, a resposta ao stress e o metabolismo dos glúcidos.

No que diz respeito ao *folding* proteico, as Hsp70 e Hsp83 desempenham um papel fundamental. As proteínas de choque térmico são moléculas intracelulares com diferentes massas moleculares as quais estão distribuídas em diferentes compartimentos celulares, incluindo o citoplasma, o núcleo, o retículo endoplasmático e o mitocôndrio [36]. Estas proteínas funcionam como chaperones no *folding* proteico e estão envolvidas na interação proteína-proteína que resulta no *unfolding* e transporte de proteínas através da membrana [37]. Em *Leishmania* spp. estas proteínas podem estar envolvidas na renaturação de proteínas danificadas devido às diferenças de temperatura a que são sujeitas durante a passagem do vector para o hospedeiro. Deste modo, estas proteínas de choque térmico são essenciais durante todo o ciclo de vida do parasita, permitindo a sua sobrevivência [38].

Estudos anteriores revelam que a S-nitrosilação da Cys66 da Hsp70 mitocondrial pode modelar a sua função como chaperone [39], podendo ser assim importante na infecção e diferenciação do parasita.

Durante o ciclo de vida, o parasita entra em contacto com vários agentes oxidativos, nomeadamente após a sua internalização pelos macrófagos, onde se dá a produção do $\cdot O_2$ e H_2O_2 , os quais também se formam em processos defensivos que ocorrem na mosca da areia [40]. Deste modo, a sobrevivência do parasita está dependente da existência de enzimas

antioxidantes, os quais podem eliminar rapidamente estes compostos. De entre estas enzimas, identificámos nitrosilados o superóxido dismutase, o qual protege o parasita do dano de radicais livres [41], e o triparedoxina peroxidase, importante na eliminação de hidroperóxidos [42].

As peroxiredoxinas são proteínas que se encontram em diversos organismos e as quais desempenham diferentes funções, incluindo a desintoxicação de células e a sinalização em processos de proliferação e diferenciação. Em parasitas como a *Leishmania*, têm um papel crucial na defesa contra o stress oxidativo, sendo necessário a interacção com a triparedoxina para exercerem a sua função [43]. Em *Leishmania infantum* foi reportada a existência de duas peroxiredoxinas, uma citoplasmática e outra mitocondrial, as quais se complementam mutuamente para a protecção dos promastigotas contra o dano oxidativo [41]. Em tripanosomatídeos, os quais não possuem o glutathione peroxidase, as peroxiredoxinas representam o peroxidase final numa cascata redox que reduz os hidroperóxidos por NADPH [44].

Recentemente, foi reportado que a S-nitrosilação da peroxiredoxina II inibe tanto a sua actividade enzimática como a sua função protectora contra o stress oxidativo. Assim sendo, é presumível que o triparedoxina peroxidase possa estar nitrosilado nos promastigotas, mas não em amastigotas.

Para além destas enzimas envolvidos no stress oxidativo, identificámos ainda o glioxalase I (GLO1) nitrosilado. Em *Leishmania infantum*, este enzima faz parte de um sistema composto por duas enzimas, o glioxalase I e o glioxalase II (GLO2), e é importante na eliminação do metilglioxal utilizando tripanotiono como cofactor [45,46]. A actividade do GLO1 varia ao longo do ciclo de vida do parasita, sendo mais baixa na fase de crescimento exponencial dos promastigotas, aumenta durante a fase estacionária e atinge o máximo de actividade em amastigotas [45,46]. Em trabalhos feitos com células endoteliais humanas, verificou-se que o glioxalase I perde actividade quando nitrosilado [47]. NO mesmo estudo com células endoteliais humanas, os autores verificaram que a inactivação do GLO1 pelo NO era maior do que a inactivação do gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (G3PDH), outro enzima sensível ao NO nestas células.

A glicólise é um processo fundamental em todos os organismos vivos. Vários enzimas glicolíticos foram também identificados como sendo nitrosiláveis: o frutose-bifosfato aldolase, o gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), o enolase e o piruvato cinase (figura 11).

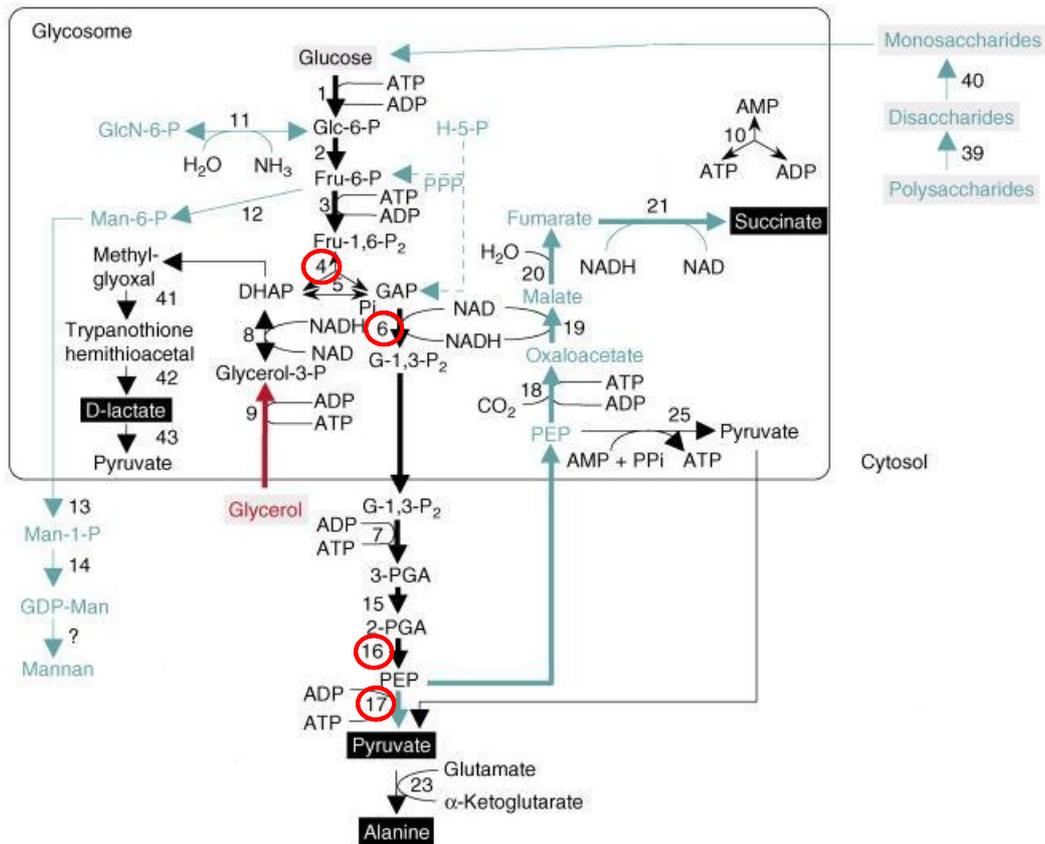


Figura 11: Algumas vias metabólicas em *Leishmania*. As vias a azul são mais importantes nos promastigotas, enquanto que a via a vermelho é mais importante nos amastigotas. Os enzimas glicolíticos S-nitrosilados aparecem destacados (4: frutose-bifosfato aldolase, 6: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, 16: enolase e 17: piruvato cinase). (esquema adaptado de [48]).

O gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é um homotetramero com uma massa molecular de 156 kDa que catalisa a fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bis-fosfoglicerato usando o NAD^+ como cofactor [35]. Estudos noutros organismos mostraram que a S-nitrosilação do GAPDH inibe a sua actividade enzimática [35]. Esta modificação deste enzima, sendo reversível, actua como um interruptor metabólico que regula os níveis de glucose, e consequentemente de energia celular, nestas células. Em *Leishmania*, a nitrosilação do GAPDH poderá ter a mesma função e exercer um papel fundamental no controlo do fluxo glicolítico. Em *Trypanosoma brucei*, este enzima e o fosfoglicerato cinase controlam parcialmente o fluxo glicolítico [49].

Um outro enzima glicolítico identificado como nitrosilavel é o enolase. Este enzima já tinha sido indentificado nos estudos por MALDI-FT-ICR. O enolase é uma proteína essencial no metabolismo de tripanosomatídeos e um possível factor de virulência nestes

parasitas [50]. Os amastigotas utilizam açúcares como fonte de carbono e energia, indicando que a glicólise é importante para este parasita. Por outro lado, foi mostrado que a gluconeogénese é uma via essencial para a síntese de glicoconjugados e β -mannan, ambos necessários para a virulência do parasita. Deste modo, o enolase pode ser considerado vital neste organismo, tornando-o num bom alvo terapêutico [50].

Para além das funções celulares conhecidas, o enolase já tinha sido reportado como alvo de glicação em levedura, tendo sido descrito como *scavanger* do metilglioxal [51]. De igual modo, este enzima pode ser um *scavanger* do NO, impedindo que este fique livre no citosol.

Através de estudos de centrifugação diferencial em *Leishmania mexicana* verificou-se que o enolase está presente maioritariamente no citosol, estando também presente na fracção microsomal, a qual contém predominantemente membrana plasmática. Esta localização do enolase na membrana plasmática foi ainda confirmada através de estudos de permeabilização celular com digitonina e através de imunofluorescência, onde se detectou que o enolase está associado à superfície externa do parasita [50]. A localização do enzima no exterior do parasita poderá ser essencial para fazer o *scavange* do NO produzido pelo hospedeiro na fase de amastigota.

4. Conclusão

A S-nitrosilação, caracterizada pela ligação covalente do NO a um tiol livre (-SH) de uma proteína, é uma modificação pós-traducional que regula uma grande variedade de funções celulares e processos de sinalização. A caracterização das proteínas S-nitrosiladas é essencial para a compreensão da acção do NO num determinado sistema biológico. Contudo, a detecção directa de tais proteínas é muito difícil devido à sua pequena massa, elevada labilidade e baixa abundância. Por exemplo, a ligação S-NO é facilmente degradada quando se realiza um SDS-PAGE e, na medida em que é sensível ao UV, a detecção destas proteínas por MALDI é também evitada. Assim, a detecção de proteínas S-nitrosiladas é feita de forma indirecta, sendo o método de Biotin-Switch a abordagem mais utilizada. Neste método, a nitrosilação é substituída por uma biotinição irreversível [52].

Este trabalho tinha como principal objectivo identificar o nitrosoproteoma em *Leishmania infantum*. A nitrosilação foi induzida utilizando um dador de NO (o SNAP) e foi utilizado o método de detecção do “biotin-switch”, seguindo-se duas abordagens proteómicas: por um lado a identificação das proteínas nitrosiladas por *peptide mass fingerprint* (PMF) utilizando MALDI-FT-ICR, por outro a análise por cromatografia líquida nano acoplada à espectrometria de massa (nanoLC-MS). Através da técnica de PMF foram detectadas 13 proteínas, enquanto que na análise por nano-LC-MS foram identificadas 225 proteínas. Esta enorme discrepância do número de identificações deve-se ao facto da técnica de nanoLC-MS ser muito mais sensível do que a de MALDI. Para tal contribui o facto de em nanoLC-MS o fluxo da amostra ser muito baixa e o facto de os *emitters* estarem colocados muito próximos da entrada do analisador de massa, o que faz com que a transmissão de iões para o analisador seja feita de uma forma mais eficiente. Por outro lado, o método de MS/MS usado em nanoLC-MS é mais sensível que o método de PMF usado em MALDI, visto que consegue fazer a distinção de diferentes péptidos com a mesma massa.

No entanto, convém realçar a possível existência de falsos positivos nas identificações que obtivemos por nanoLC-MS, como é o caso das diversas histonas, uma vez que estas interagem com a streptavidina, independentemente destas proteínas se encontrarem biotiniladas ou não [53].

Através dos resultados obtidos, podemos verificar que a S-nitrosilação poderá estar envolvida em vários processos celulares, nomeadamente no *foldings* proteico, na resposta ao *stress*, na tradução, na sinalização e no metabolismo, sendo o mais relevante o metabolismo de glúcidos, sendo que só analisamos alguns destes processos celulares. De entre as proteínas identificadas como S-nitrosiladas, as proteínas de choque térmico Hsp 70 e Hsp 83

são importantes para infecção e diferenciação do parasita, sendo que a S-nitrosilação poderá ajudar na função destas proteínas como chaperones. Quatro proteínas da glicólise também foram identificadas como S-nitrosiladas, sugerindo que esta PTM poderá estar envolvida no controlo do fluxo glicolítico. Apesar no enolase estar maioritariamente presente no citosol, é interessante o facto deste enzima também se encontrar no exterior do parasita, sugerindo que pode ser importante para fazer o *scavange* do NO produzido pelo hospedeiro na fase de amastigota. Verificou-se ainda a S-nitrosilação de enzimas envolvidos no stress oxidativo, triparedoxina peroxidase, e no stress carbonílico, glioxalase I. Esta modificação pelo óxido nítrico poderá inibir a actividade enzimática destas duas proteínas.

4.1 Perspectivas Futuras

Para uma futura continuação deste trabalho, seria importante identificar os locais de nitrosilação, ou seja, identificar quais as cisteínas que vão ficar nitrosiladas aquando da sua exposição ao óxido nítrico. Por outro lado, seria também de extrema importância identificar o nitrosoproteoma do parasita *Leishmania infantum* na forma de amastigota e comparar com o nitrosoproteoma da sua forma de promastigota. Num futuro próximo, seria relevante fazer este mesmo tipo de estudos sem indução da nitrosilação, de forma a conseguir perceber quais são realmente as proteínas que estão nitrosilados na forma basal do parasita e determinar quais os processos celulares em que tais proteínas actuam.

5. Bibliografia

1. Bhattacharya, S.K., Sur, D., and Karbwang, J. Childhood visceral leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.*, 2006. **123**: p. 353–356.
2. Bern, C., Maguire, J.H., and Alvar, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis, 2008. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2
3. Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., and Den Boer, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, 2012. *PLoS ONE* 7:e35671.
4. Campino, L. Canine reservoirs and leishmaniasis: epidemiology and disease. *World Class Parasites, Leishmania*. 2002. **4**: p. 45-57.
5. Campino, L. Leishmanioses em Portugal. Características emergentes da epidemiologia e do diagnóstico. Tese. 1998. p. 192.
6. Ashford, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol*, 1996. **14**: p. 523–532.
7. Calheiros, J., Casimiro, E. Saúde Humana e implicações para o Turismo. Alterações Climáticas em Portugal. Cenários e Medidas de Adaptação. Projecto SIAM II, 2006. p. 223-270.
8. WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases – Leishmaniasis
9. McCall, L.I., Zhang, W.W., Matlashewski, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLoS Pathogens*, 2013. **9**: 1-5
10. Site World Health Organization (Junho e Julho 2010) www.who.int/leishmaniasis/burden/en
11. Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 2008. **366**: p. 1561–1577.
12. Callahan, H.L., Portal, I.F., Bensinger, S.J., Grogl, M. *Leishmania* spp: temperature sensitivity of promastigotes in vitro as a model for tropism in vivo. *Exp Parasitol*, 1996. **84**: p. 400–409.
13. Sarkar, A., Ghosh, S., Pakrashi, S., Roy, D., Sen, S., et al. *Leishmania* strains causing self-healing cutaneous leishmaniasis have greater susceptibility towards oxidative stress. *Free Radic Res*, 2012. **46**: 665–673.

14. Liu, D., Uzonna, J.E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2012 **2**: 1-7
15. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e0/Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg/612px-Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg.png
16. Antoine, J.C., Prina, E., Lang, T., and Courret, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbor Leishmania in murine macrophages. *Trends Microbiol*, 1998. **6**: p. 392–401.
17. Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., Solbach, W., and Laskay, T. Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serumfactors. *Infect. Immun*, 2002. **70**: p. 826–835
18. Srivastava, P., et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2011. **105(1)**: p. 1-6.
19. Dujardin, J.C., et al. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 2008. **14**: p. 1013-1018
20. Tiuman, T.S., et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis*, 2011. **15(8)**: p. e525-32.
21. Sundar, S. et al. Implementation research to support the initiative on the elimination of kala azar from Bangladesh, India and Nepal – the challenges for diagnosis and treatment. *Tropical Medicine and International Health*, 2008. **13**: p. 2-5
22. Liu, L., Yan, Y., Zeng, M., Zhang, J., Hanes, M.A., Ahearn, G., McMahon, T.J., Dickfeld, T., Marshall, H.E., Que, L.G., Stamler, J.S. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*, 2004. **116**: p. 617–628.
23. Murad, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Bioscience Reports*, 1999. **19**: p. 133-154
24. Bogdan, C. et al. The function of nitric oxide in the immune system. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2000. **Nitric Oxide (Mayer B, ed)**: p. 443–492.
25. Tripathi, P. et al. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2007. **51**: p. 443-452
26. Liew, F. Y. et al. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *The Journal of Immunology*, 1990. **144**: p. 4794-4797

27. Derakhshan, B., Wille, P.C., Gross, S.S. Unbiased identification of cysteine S-nitrosylation sites on proteins. *Nat Protoc.*, 2007;2(7): p.1685-91.
28. Mannick J.B., Schonhoff C.M. Nitrosylation: the next phosphorylation?. *Arch. Biochem. Biophys*, 2002. **408**: p. 1–6
29. Daverie-Baez, N.O., Zhang. D., Li, S., Whorton, A.R., Xian, M. Direct methods for detection of protein S-nitrosylation. *Methods Related to Nitric Oxide Signalling*, 2013. 62: p.171-176
30. Jaffrey, S.R., Snyder, S.H. The Biotin Switch Method for the Detection of S-Nitrosylated Proteins. *ci. STKE*, 2001.
31. Zilberstein, D. Physiological and biochemical aspects of *Leishmania* development. *Leishmania after the genome*. Norfolk, 2008. p. 107-22.
32. Dea-Ayuela, M.A., Ordonez-Gutierrez, L., Bolas-Fernandez, F. Changes in the proteome and infectivity of *Leishmania infantum* induced by in vitro exposure to a nitric oxide donor. *Int J Med Microbiol*, 2009. **299**: p.221-232
33. Sliskovic, I., Raturi, A., Mutus, B. Characterization of the S-denitrosation activity of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem*, 2005: **280**: p. 8733–8741
34. Huang, B., Li, F.A., Wu, C.H., Wang, D.L.. The role of nitric oxide on rosuvastatin-mediated S-nitrosylation and translational proteomes in human umbilical vein endothelial cells. *Proteome Science*, 2012. **10**: p.43
35. Ignarro, L.J. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. 2010. **2**: p.354
36. Tai, L.J., McFall, S.M., Huang, K., Demeler, B., Fox, S.G., Brubaker, K. et al. Structure function analysis of the heat shock factor binding protein reveals a protein composed solely of a highly conserved and dynamic coiled-coil trimerization domain. *J Biol Chem*, 2002. **277(1)**: p. 735-45.
37. Chirico, W.J., Waters, M.G., Blobel, G. 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, 1988. **332**: p.805-10
38. Zilberstein, D., Shapira, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Rev. Microbiol*, 1994. **48**: p. 449-70
39. Zanella, B., Giordano, E., Muscari, C., Zini, M., Guarnieri, C. Nitric oxide synthase activity in rat cardiac mitochondria. *Basic Res. Cardiol.*, 2004. **99**: p. 159–164
40. Murray, H. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *J. Exp. Med.*, 1981. **153**: p. 1302-1315

41. Paramchuk, W. J., Ismail, S. O., Bhatia, A., Gedamu, L. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol*, 1997. **90**: p. 203–221
42. Castro, H., Sousa, C., Santos, M., Cordeiro-da-Silva, A., Flohé, L., Tomás, A.M. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *leishmania infantum*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002. **33**: p. 1552–1562
43. Tetaud, E., Giroud, C., Prescott, A. R., Parkin, D. W., Baltz, D., Biteau, N. Baltz, T. Fairlamb, A. H. Molecular characterization of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent trypanothione peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2001. **116**: p. 171–183
44. Nogoceke, E., Gommel, D. U., Kiess, M., Kalisz, H.M., and Flohe, L. *Biol. Chem*, 1997. **378**: p. 827–836
45. Barata, L., Sousa Silva, M., Schuldt, L., Tomás, A.M., Ferreira, A.E.N., Weiss, M.S., Ponces Freire, A., Cordeiro, C. Cloning, Expression, Purification, Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of Glyoxalase I from *Leishmania infantum*. *Acta Crystallographica Section F*, 2010. **66**: p. 571-574
46. Silva, M.S., Ferreira, A.E.N, Gomes, R., Tomás, A.M., Freire, A.P., Cordeiro, C. The glyoxalase pathway in protozoan parasites. *International Journal of Medical Microbiology*, 2012. **302**: p. 225-229
47. Mitsumoto, A., Kim, K.R., Oshima, G., Kunimoto, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nakagawa, Y. Glyoxalase I as a novel nitric-oxide-responsive protein. *Biochem J.*, 1999. **344(Pt 3)**: p. 837–844.
48. Opperdoes, F.R., Coombs, G.H. *Metabolism of Leishmania: proven and predicted*. Cell Press, 2007. **23**: p.149-158
49. Albert, M.A., Haanstra, J.R., Hannaert, V., Van Roy, J., Opperdoes, F.R., Bakker, B.M., Michels, P.A. Experimental and in silico analyses of glycolytic flux control in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem*, 2005. **280**: p- 28306-28315
50. Avilán, L., Gualdrón-López, M., Quiñones, W., et al. Enolase: A Key Player in the Metabolism and a Probable Virulence Factor of Trypanosomatid Parasites—Perspectives for Its Use as a Therapeutic Target. *Enzyme Research*, 2011. p.14
51. Gomes, R.A, et. All. Protein glycation *in vivo*: functional and structural effects on yeast enolase. *Biochem. J.*, 2008. **416**: p. 317–326

52. Liu, M., et al. Site-Specific Proteomics Approach for Study Protein S-Nitrosylation. *Anal. Chem.*, 2010. **82**: p. 7160–7168
53. Bailey, L.M., Ivanov, R.A., Wallace, J.C., Polyak, S.W. Artifactual detection of biotin on histones by streptavidin. *Anal Biochem.*, 2008. **373(1)**: p. 71-77

6. Anexos

Tabela A4- Nome, função / processo biológico, localização celular e massas moléculas das proteínas S-nitrosiladas identificadas por nanoLC-MS.

UniProt ID	Nome das proteínas	Função / Processo Biológico	Localização Celular	Massa Molecular (Da)
A4HRK0	Provável fator de iniciação eucariota 4A	Tradução	Citosol	45,327
A4HRL2	Proteína não caracterizada	-	-	38,463
A4HRY4	Factor de elongação 2, subunidade alfa, Putativa	Tradução	Citosol	46,606
A4HSG0	Proteína associada a microtubulos, putative	Regulação do citoesqueleto	Citoesqueleto	165,160
A4HSH2	ATP sintase, subunide alfa	Metabolismo Energético	Mitocôndrio	62,549
A4HSW6	Proteína não caracterizada	-	-	100,312
A4HT02	Proteína não caracterizada	-	-	32,277
A4HTP4	HOP	Proteína de resposta ao stress / Folding Proteico	Citosol / Núcleo	62,239
A4I8U5	Beta-tubulina	Regulação do citoesqueleto	Citosol	49,740
A4HTR1	Beta-tubulina	Regulação do citoesqueleto	Citosol	49,739
A4HTR0	Beta-tubulina	Regulação do citoesqueleto	Citosol	49,800
A4HZJ3	Beta-tubulina	Regulação do citoesqueleto	Citosol	49,753
A4HU13	Calmodulina, Putativa	Sinalização (Ligação ao cálcio) / NO synthesis	Citosol / Núcleo / Mitocôndrio	16,825
Q9BHZ6	Factor de elongação-1 gama	Tradução	Citosol	46,244
A4HU19	Factor de elongação-1 gama	Tradução	Citosol	46,375
A4HU18	Factor de elongação-1 gama	Tradução	Citosol	51,576
A4HVX3	Subunidade alfa do proteossoma	Folding Proteico / Degradação Proteica	Núcleo / Citosol	32,207
A4HV47	Subunidade beta do proteossoma	Folding Proteico / Degradação Proteica	Núcleo / Citosol	30,302
A4HVG8	Proteína não caracterizada	Ligação aos ácidos nucléicos	Núcleo	13,406
A4HVQ2	Proteína não caracterizada	Metabolismo Energético	Citosol	58,668
A4HVV8	Proteína não caracterizada	-	-	36,335
A4HW09	faty acid elongase	Metabolismo de ácidos gordos	Região Perinuclear	32,346
A4HW62	Enolase	Metabolismo de glúcidos	Citosol	46,037
Q8MU50	Proteína antioxidade especifica do tiol	Resposta ao stress	Citosol	20,637
Q95NF5	Peroxiredoxina citosol (Triparedoxina peroxidase)	Resposta ao stress	Citosol	22,138
A4HWK3	Triparedoxina peroxidase	Resposta ao stress	Citosol	21,280
A4HWK2	Triparedoxina peroxidase	Resposta ao stress	Citosol	22,181
A4HX73	Factor de elongação 1-alfa	Tradução	Citosol	49,129
E9AGP5	Factor de elongação 1-alfa	Tradução	Citosol	55,404
E9AGP7	Factor de elongação 1-alfa	Tradução	Citosol	48,588
A4HXY3	cAMP fosfodiesterase A	Sinalização	Citosol	70,876
A4HY43	Proteína transportadora de ADP/ATP, mitocondrial	Transporte / Metabolismo Energético	Mitocôndrio	35,154
A4HY71	Proteína não caracterizada	-	-	23,833
A4HYV5	DNAj-like protein	Folding Proteico / Regulação de genes	Citosol	74,622
A4HYX1	calpain-like cysteine peptidase, Putativa	Sinalização (Ligação do cálcio) / Degradação Proteica / Regulação do citoesqueleto	Citosol / Parasitophorous vacuole / lisosoma	17,036
A4HW29	calpain-like cysteine peptidase, Putativa	Sinalização (Ligação do cálcio) / Degradação Proteica / Regulação do citoesqueleto	Citosol / Parasitophorous vacuole / lisosoma	12,931
A4I2N7	calpain-like cysteine peptidase	Sinalização (Ligação do cálcio) / Degradação Proteica / Regulação do citoesqueleto	Citosol / Parasitophorous vacuole / lisosoma	75,018 to 80,055

E9AHC1	calpain-like cysteine peptidase, Putativa	Sinalização (Ligação do cálcio) / Degradação Proteica	Citosol / Parasitophorous vacuole / lisosoma	489,824
A4I4D6	peptidase da cisteína C (familia C1)	Degradação Proteica	lisosoma / Flagellar pocket	37,019
Q8WT30	peptidase da cisteína C (familia C1)	Degradação Proteica	lisosoma / Flagellar pocket	37,033
A4HYX2	Proteína não caracterizada (Putativa nucleosome assembly protein)	Regulação de genes	Núcleo	31,228
A4HZ42	Proteína não caracterizada (Nuclear Transporte factor 2 domain)	Regulação de genes	Núcleo	46,710
A4HZ53	Putativa la RNA binding protein	Regulação de genes	Núcleo	36,869
A4HZE0	Putativa 2-oxoisovalerato desidrogenase subunidade alfa	Metabolismo de glúcidos / Metabolismo de aminoácidos	Mitocôndrio	53,379
A4HZF7	Proteína não caracterizada	-	-	46,590
A4HZI2	Putativa centromere/microtubule binding protein cbf5	Tradução	Núcleo	48,569
A4I7K9	Proteína Ribossomal 40S S2	Tradução	Ribossoma	28,644
E9AGQ8	Proteína Ribossomal 40S S2	Tradução	Ribossoma	28,759
Q9N9V4	Proteína Ribossomal 40S S25	Tradução	Ribossoma	13,046
A4IAU1	Proteína Ribossomal 40S S3a-2	Tradução	Ribossoma	30,008
A4IAU0	Proteína Ribossomal 40S S3a-1	Tradução	Ribossoma	30,038
O44012	Proteína Ribossomal 40S S6	Tradução	Ribossoma	28,311
A4HZI4	Proteína Ribossomal 40S S6	Tradução	Ribossoma	28,276
A4IDS4	Proteína Ribossomal 40S SA	Tradução	Ribossoma	27,528
A4I011	Proteína Ribossomal 40S L14, Putativa	Tradução	Ribossoma	26,001
A4ICN5	Proteína Ribossomal 40S S10, Putativa	Tradução	Ribossoma	18,590
A4HY61	Proteína Ribossomal 40S S13, Putativa	Tradução	Ribossoma	17,419
A4HV26	Proteína Ribossomal 40S S15A, Putativa	Tradução	Ribossoma	14,696
A4HUY6	Proteína Ribossomal 40S S21, Putativa	Tradução	Ribossoma	17,070
A4HUY7	Proteína Ribossomal 40S S21, Putativa	Tradução	Ribossoma	31,692
A4HWJ3	Proteína Ribossomal 40S S3, Putativa	Tradução	Ribossoma	24,472
A4HVQ0	Proteína Ribossomal 40S S4, Putativa	Tradução	Ribossoma	30,650
A4HVQ1	Proteína Ribossomal 40S S4, Putativa	Tradução	Ribossoma	53,477
A4HS42	Proteína Ribossomal 60S L11	Tradução	Ribossoma	21,661
A4IC63	Proteína Ribossomal 60S L37	Tradução	Ribossoma	9,129
P62886 / E9AHN8	Proteína Ribossomal 60S L37	Tradução	Ribossoma	9,835
A4I4W0	Proteína Ribossomal 60S L13 ,Putativa	Tradução	Ribossoma	24,747
A4I7K7	Proteína Ribossomal 60S L17 ,Putativa	Tradução	Ribossoma	19,083
A4I0M7	Proteína Ribossomal 60S L17 ,Putativa	Tradução	Ribossoma	19,113
A4HVI5	Proteína Ribossomal 60S L18 ,Putativa	Tradução	Ribossoma	22,022
A4IAD2	Proteína Ribossomal 60S L21 ,Putativa	Tradução	Ribossoma	18,019
A4HWU4	Proteína Ribossomal 60S L21 ,Putativa	Tradução	Ribossoma	17,991
A4ID69	Proteína Ribossomal 60S L22 ,Putativa	Tradução	Ribossoma	15,002
A4IDM1	Proteína Ribossomal 60S L22 ,Putativa	Tradução	Ribossoma	15,903
A4I114	Proteína Ribossomal 60S L35 ,Putativa	Tradução	Ribossoma	16,176
A4I2G1	Proteína Ribossomal 60S L26 ,Putativa	Tradução	Ribossoma	15,191
E9AHI5	Proteína Ribossomal putativaL1a	Tradução	Ribossoma	41,097
A4I4G7	Proteína Ribossomal putativaL1a	Tradução	Ribossoma	41,150
A4I890	Proteína Ribossomal putativaL27	Tradução	Ribossoma	15,420
A4I8D8	Proteína Ribossomal putativaL3	Tradução	Ribossoma	47,566
A4I8D7	Proteína Ribossomal putativaL3	Tradução	Ribossoma	47,524

A4I3C8	Proteína Ribossomal putativaS26	Tradução	Ribossoma	12,761
A4HRG4	Proteína Ribossomal putativaS7	Tradução	Ribossoma	23,816
Q9N9V8	Proteína RibossomalL15	Tradução	Ribossoma	24,436
A4I7S4	Putativa small nuclear ribonucleoprotein	Regulação de genes	Núcleo	8,760
A4HZQ8	Proteína não caracterizada	-	-	60,724
A4I074	Putativa (H+)-ATPase G subunidade	Metabolismo Energético	Mitocôndrio	12,429
A4I0V9	Putativa factor de tradução sui1	Tradução	Citosol	12,372
A4I191	Proteína de ligação ao RNA, Putativa, UPB2	Regulação de genes	Citosol / Núcleo	19,005
E9AH94	Proteína de ligação ao RNA, Putativa, UPB2	Regulação de genes	Citosol / Núcleo	26,670
A4I2Y0	Putativa Proteína de ligação ao RNA	Regulação de genes	Citosol / Núcleo	49,712
A4I1D2	Peptidil-proil cis-trans isomerase	Folding Proteico	Citosol	18,771
A4I1E4	Dehydrogenase-like protein	Metabolismo de glúcidos	Citosol	45,594
A4I1I6	Putativa GTP-binding protein (GTP-binding nuclear protein Ran)	Sinalização	Citosol / Núcleo	24,224
A4I4S9	Putativa GTP-binding protein (Dynammin 1-like protein)	Endocitose	Citosol	77,988
A4I1J5	Proteína não caracterizada (Putativa Rab GTPase activator)	Sinalização / Regulação do citoesqueleto	Citosol	135,203
A4I1K7	Proteína não caracterizada (JAB ubiquitin protease family motif)	Folding Proteico	Citosol	36,657
A4I1L9	Piruvato desidrogenase E1 subunidade beta, Putativa	Metabolismo de glúcidos	Mitocôndrio	37,846
A4I1P9	Putativa 2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	Metabolismo de glúcidos	Citosol	30,401
A4HZ54	Dihydrolipoamide acetyltransferaselike protein	Metabolismo de glúcidos	Mitocôndrio	40,183
A4I3X3	2-oxoglutarato desidrogenase, componente E2, Putativa	Metabolismo de glúcidos	Mitocôndrio	41,805
A4I2P6	2-oxoglutarato desidrogenase, componente E2, Putativa	Metabolismo de glúcidos	Mitocôndrio	112,904
A4I2N0	Proteína não caracterizada	-	-	61,741
A4I2R2	Proteína de ligação ao RNA 1, mitocondrial	Regulação de genes	Mitocôndrio	26,646
A4I2T3	Proteína não caracterizada (Putativa ATP-dependent RNA helicase)	Regulação de genes	Citosol	59,993
A4I7K4	Putativa ATP-dependente RNA helicase	Regulação de genes / Tradução	Citosol / Ribossoma	66,809
A4IBK1	Putativa ATP-dependente RNA helicase	Regulação de genes / Tradução	Citosol / Ribossoma	100,538
A4I2V4	Factor de iniciação eIF-4E, Putativa	Tradução	Citosol	23,610
A4I2X9	Proteína não caracterizada	-	-	17,434
A4I2Y7	Fosfoenolpiruvato carboxicinase glicossomal, Putativa	Metabolismo de glúcidos	Glicossoma	58,273
A4I303	Proteína não caracterizada (Intraflagellar Transporte protein 43 motif)	Regulação do citoesqueleto	Flagelo	44,524
A4I341	Putativa Proteína de choque térmico DNAJ	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	43,648
A4I1Z4	Putativa 10 kDa Proteína de choque térmico	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	10,708
A4I253	Proteína de choque térmico 70-related protein	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	70,465
A4I4I2	Putativa proteína de choque térmico hsp70	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	71,268
E9AHH1	Putativa proteína de choque térmico hsp70	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	80,381
Q94594	Proteína de choque térmico 70	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	71,078
Q25292	Proteína de choque térmico 70	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	71,163
I3VJX3	proteína de choque térmico 70	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	48,583
I2EBQ4	70 kDa Proteína de choque térmico	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	50,400
G9IAJ3	proteína de choque térmico 70	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	50,342
G9IAJ2	proteína de choque térmico 70	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	50,314

D2EAV3	proteína de choque térmico 70	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	50,372
E9AHH0	Putativa proteína de choque térmico hsp70	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	68,344
C5MKJ9	Proteína de choque térmico 70	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	71,921
A4I5T0	Putativa related proteína de choque térmico 70, mitocondrial	Folding Proteico / Resposta ao stress	Mitocôndrio	71,658
A4I5S5	Putativa related proteína de choque térmico 70, mitocondrial	Folding Proteico / Resposta ao stress	Mitocôndrio	71,677
A4I5S9	Putativa related proteína de choque térmico 70, mitocondrial	Folding Proteico / Resposta ao stress	Mitocôndrio	71,707
A4I5S4	Putativa related proteína de choque térmico 70, mitocondrial	Folding Proteico / Resposta ao stress	Mitocôndrio	68,847
A4I480	Proteína não caracterizada	-	-	46,760
A4I4A3	ADF/Cofilina	Regulação do citoesqueleto	Citosol	15,801
A4I4X0	Putativa serina/threonine-proteína cinase	Sinalização	Citosol	56,267
A4I5X6	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, glicosomal	Metabolismo de glúcidos / Resposta ao stress	Glicossoma	39,089
A4I5B8	Putativa surface protein amastin	Interação com o patógeno hospedeiro	Membrana (superfície celular)	21,275
A4I504	Proteína não caracterizada	-	-	26,760
A4I584	Proteína não caracterizada	-	-	36,714
A4I950	Proteína não caracterizada	-	-	57,744
A4I9C1	Proteína não caracterizada	-	-	17,099
A4I5J6	Proteína não caracterizada	-	-	37,570
A4I6A1	Proteína não caracterizada (Metal-binding motif)	-	Citosol	25,600
A4I6M9	Proteína não caracterizada	-	-	38,661
A4I7G5	Proteína não caracterizada	-	-	56,354
A4I4I1	Proteína não caracterizada (Putativa HSP70 motif)	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	79,390
A4I7Q0	Proteína não caracterizada (Putativa RNA recognition motif)	Regulação de genes	Núcleo / Citosol	56,061
A4I7Q3	Putativa fenilalanil-tRNA sintetase cadeia alfa	Tradução	Citosol	56,726
A4I7Z7	Superoxido dismutase (SODB1, Fe-Mn family)	Resposta ao stress	Glicossoma	21,527
A4I7Z8	Superoxido dismutase (SODB2, Fe-Mn family)	Resposta ao stress	Glicossoma	23,049
A4I860	Proteína não caracterizada	-	-	87,618
A4I883	Proteína não caracterizada (Putativa LYR motif)	-	Mitocôndrio	36,122
A4I8A2	Proteína Putativa de ligação ao RNA	Tradução	Ribossoma	51,267
A4I8F6	Dihidrolipoil desidrogenase	Resposta ao stress	Citosol	50,618
A4I9P7	Putative ubiquitin-conjugating enzyme e2	Degradação Proteica	Citosol / Núcleo	31,550
A4I9Q8	Putativa uracilo fosforibosiltransferase	Metabolismo de pirimidina	Citosol	27,172
A4IA34	Proteína não caracterizada (Putativa RNA binding motif)	Regulação de genes	-	21,992
A4IA61	Regulatory subunit of protein kinase a-like protein	Sinalização	Citosol	71,568
A4IAL9	Proteína não caracterizada (Putativa Transcription factor Pcc1 motif)	Regulação de genes	-	13,389
A4IAN1	Proteína não caracterizada (Putativa Epimerase motif)	Metabolismo de glúcidos	Citosol	55,480
A4IAQ4	Piruvato cinase	Metabolismo de glúcidos	Citosol	49,504
A4IAQ1	Piruvato cinase	Metabolismo de glúcidos	Citosol	55,193
A4IAW4	Proteína não caracterizada	-	-	457,090
A4IB02	Proteína não caracterizada (Putativa protein serine/threonine kinase)	Sinalização	Citosol	53,965
Q25298	Kinetoplastid membrane protein 11C	Regulação do citoesqueleto / Resposta defensiva	Citosol	11,263
Q25297	Kinetoplastid membrane protein 11B	Regulação do citoesqueleto / Resposta defensiva	Citosol	11,177
G1AQL5	Kinetoplastid membrane protein-11	Regulação do citoesqueleto / Resposta	Citosol	11,173

		defensiva		
A4IBB3	Kinetoplastid membrane protein 11-1	Regulação do citoesqueleto / Resposta defensiva	Citosol	11,235
A4IBB2	Kinetoplastid membrane protein 11-2	Regulação do citoesqueleto / Resposta defensiva	Citosol	11,236
A4IBI9	Glioxalase I	Metabolismo de glúcidos / Resposta ao stress	Citosol	15,734
Q2PYM9	Glioxalase I	Metabolismo de glúcidos / Resposta ao stress	Citosol	16,362
A4IBP5	Proteína não caracterizada (Putativa Proteína de ligação ao RNA PNO1)	Regulação de genes	Núcleo	24,457
A4ICD7	Proteína não caracterizada	-	-	34,289
A4ICD8	Putativa eukaryotic Traduçãofactor de iniciação 3 subunit 8	Tradução	Citosol	81,861
A4ICJ9	Putativa Transitional Reticulo Endoplasmático ATPase	Degradação Proteica	Reticulo Endoplasmático	76,569
A4ICK2	Putativa N-acetyltransferase subunit Nat1	?	?	81,488
A4ICK8	Frutose-bisfosfato aldolase	Metabolismo de glúcidos	Citosol	40,720
A4ICW8	Factor de elongação 2	Tradução	Citosol	94,147
A4ID05	Adenosilhomocisteinase	Metabolismo de aminoácidos	-	47,768
A4IDD2	Universal minicircle sequence binding protein	-	-	12,612
A4IDD1	Putativa universal minicircle sequence binding protein	-	-	12,566
A4IDD4	Putativa poly-zinc finger protein 2	-	-	14,554
A4IDD5	Putativa universal minicircle sequence binding protein	-	-	28,167
A4IDK1	Proteína não caracterizada	-	-	50,159
A4IDP5	Proteína não caracterizada	-	-	14,362
A4IDT2	Proteína não caracterizada	-	-	103,464
A4IDZ8	Proteína não caracterizada	-	-	58,231
E9AGJ8	Alfa tubulina	Regulação do citoesqueleto	Citosol	49,759
E9AGK7	Alfa tubulina	Regulação do citoesqueleto	Citosol	54,181
A4HVG1	Alfa tubulina	Regulação do citoesqueleto	Citosol	36,329
E9AGQ0	Putativa ATP-dependent RNA helicase	Tradução	Ribossoma	30,628
E9AH85	Fatty acid Transporter protein-like protein	Metabolismo de ácidos gordos	-	144,142
E9AHD5	Proteína não caracterizada	-	-	19,558
E9AHI1	Proteína não caracterizada	-	-	14,095
E9AHM8	Proteína de choque térmico 83-1	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	78,786
E9AHM9	Proteína de choque térmico 83-1	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	80,551
Q25293	Proteína de choque térmico 83-1	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	80,680
E9AHQ2	Succinil-CoA:3-cetoacido-coenzima A transferase	Metabolismo de aminoácidos	Mitocôndrio	52,630
E9AHQ7	Proteína de choque térmico, Putativa	Folding Proteico / Resposta ao stress	Citosol	73,013
Q2PD92	Aspartato aminotransferase	Metabolismo de aminoácidos	-	46,120
Q9GNZ8	Subunidade alfa do proteossoma	<i>Folding, sorting</i> e degradação	Núcleo / Citosol	25,073
C5MKJ9	Difosfate cinase Nucleosido	Metabolismo de nucleótidos	-	71,921
Q9NIS2	<i>22 kDa potentially aggravating protein papLe22</i>	-	Reticulo Endoplasmático	22,000
Q9BJC8	Histona H2A	Regulação de genes	Núcleo	13,951
Q8WT38	Histona H2A	Regulação de genes	Núcleo	13,945
Q8WT37	Histona H2A	Regulação de genes	Núcleo	13,961
Q8WT36	Histona H2A	Regulação de genes	Núcleo	13,897
Q8WT35	Histona H2A	Regulação de genes	Núcleo	13,849
Q8WT33	Histona H2A	Regulação de genes	Núcleo	13,880

Q8WT32	Histona H2A	Regulação de genes	Núcleo	13,891
E9AGW1	Histona H2A	Regulação de genes	Núcleo	13,905
E9AGW0	Histona H2A	Regulação de genes	Núcleo	13,935
P27891	Histona H2A.1	Regulação de genes	Núcleo	13,892
P27892	Histona H2A.2	Regulação de genes	Núcleo	13,819
E9AGQ7	Histona H2B	Regulação de genes	Núcleo	11,861
A4HU57	Histona H2B	Regulação de genes	Núcleo	12,272
A4HY42	Histona H2B	Regulação de genes	Núcleo	14,830
O02612	Histona H2B	Regulação de genes	Núcleo	12,159
A4HXJ9	Histona H2B	Regulação de genes	Núcleo	12,535
Q6LAQ2	Histona 3	Regulação de genes	Núcleo	10,420
A4HUL0	Histona H3	Regulação de genes	Núcleo	9,612
P40285	Histona H3	Regulação de genes	Núcleo	14,629
A4HUJ9	Histona H3	Regulação de genes	Núcleo	14,633
A4HWV9	Histona H3, Putative	Regulação de genes	Núcleo	14,623
A4HW98	Histona H4	Regulação de genes	Núcleo	11,422
A4IB25	Histona H4	Regulação de genes	Núcleo	11,408
O00913	Histona H4	Regulação de genes	Núcleo	11,437
O00912	Histona H4	Regulação de genes	Núcleo	11,453