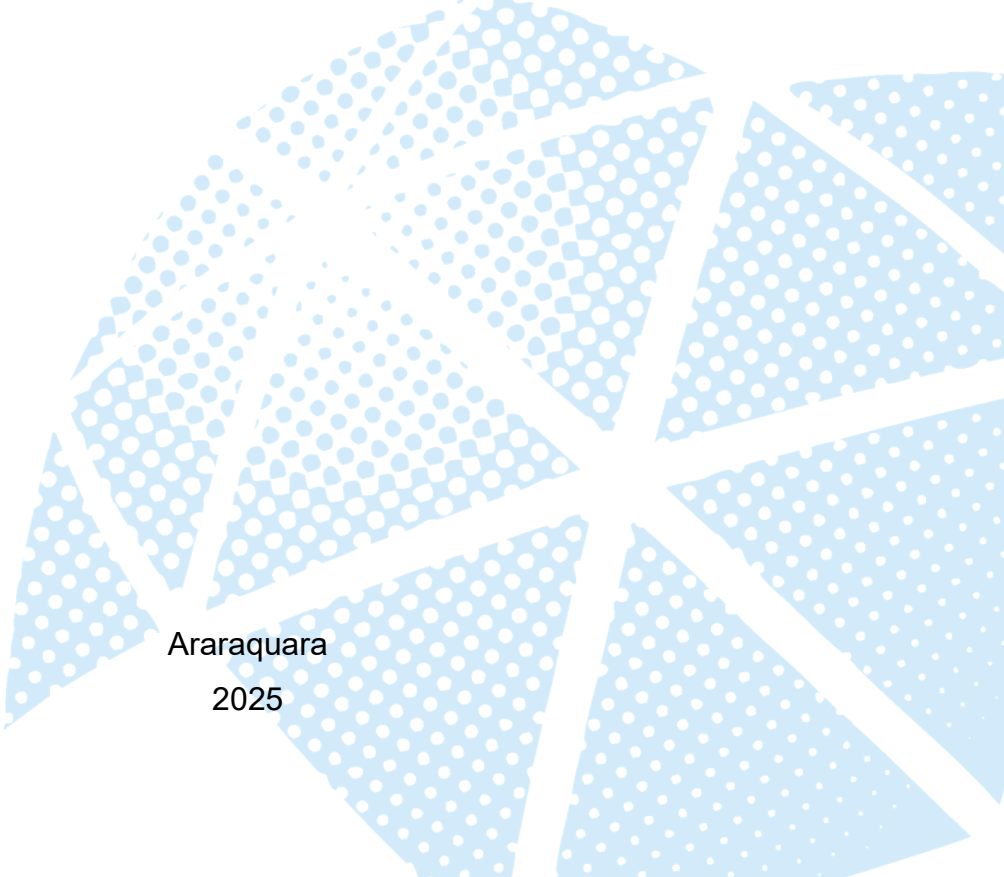


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

RAFAELA PORCIUNCULA RIBEIRO

**PERFIL METABÓLICO DA RESPOSTA ENDOCELULAR DE PROMASTIGOTAS
DE LEISHMANIA AMAZONENSIS À MILTEFOSINA**

Araraquara
2025



RAFAELA PORCIUNCULA RIBEIRO

**PERFIL METABÓLICO DA RESPOSTA ENDOCELULAR DE PROMASTIGOTAS
DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* À MILTEFOSINA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção
do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Alan Cesar Pilon

Coorientador: Me. Emanuel Victor dos
Santos Nunes

Araraquara

2025

R484p

Ribeiro, Rafaela Porciuncula.

Perfil metabólico da resposta endocelular de promastigotas de *Leishmania amazonensis* à miltefosina / Rafaela Porciuncula Ribeiro. – Araraquara, 2025.
43 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara.

Orientador: Alan Cesar Pilon.

Coorientador: Emanuel Victor dos Santos Nunes.

1. *Leishmania amazonensis*. 2. Metabolômica. 3. Miltefosina. 4. Parasitos. 5. *Leishmania*. I. Pilon, Alan Cesar, orient. II. Nunes, Emanuel Victor dos Santos, coorient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

Esta ficha não pode ser modificada

RAFAELA PORCIUNCULA RIBEIRO

**PERFIL METABÓLICO DA RESPOSTA ENDOCELULAR DE PROMASTIGOTAS
DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* À MILTEFOSINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Data da defesa: 01/12/2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alan Cesar Pilon
UNESP - Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista - Campus de Araraquara

Prof. Dr. João Aristeu Rosa
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Prof. Dr. Isabele Rodrigues Nascimento
UNESP - Instituto de Química de Araraquara

Prof. Dr(a). Michele Ferreira Da Silva Mela
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Prof. Dr. Natália Caroline Costa Coelho
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais Marislene e Marcus por todo o apoio que obtive desde sempre, que apesar de qualquer dificuldade, sempre incentivaram meus estudos e pelo suporte para enfrentar os 6 anos de graduação estando longe de casa. Sem eles eu não teria chegado nem na metade do caminho. Agradeço também ao restante da minha família Julia, Alice, meus tios, tias, meus avós, primos e minha namorada pelo incentivo de não desistir nunca e continuar por todos eles. A todos os amigos que fiz em Araraquara, obrigada por terem se tornado meu segundo lar e obrigada por terem sido muito mais que boas risadas, companhia e abrigo, devo todos os meus melhores momentos nesta cidade à vocês. Obrigada também ao meu orientador Alan, e meu co-orientador Emanuel pela orientação, dedicação e por compartilhar seus conhecimentos e contribuir para o desenvolvimento deste trabalho e aos meus professores e os funcionários da UNESP, pelo ensino de qualidade e pela contribuição na minha formação profissional e pessoal.

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas, juntamente com a doença de chagas, malária, dengue, tuberculose e hanseníase, afetando mais de 1 bilhão de pessoas globalmente. Especificamente, a Leishmaniose está presente em mais de 99 países, principalmente em regiões tropicais, subtropicais e mediterrâneas, impactando de forma significativa a saúde de populações economicamente desfavorecidas. No tratamento da leishmaniose, empregam-se principalmente antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina e, mais recentemente, a miltefosina, primeiro fármaco oral aprovado para a doença, embora seu uso seja limitado por efeitos adversos e resistência. Além disso, seus mecanismos fisiopatológicos ainda são pouco compreendidos em nível molecular, o que dificulta o processo de descobrimento de novos fármacos e o elucidar de seus mecanismos de ação. Nesse contexto, a metabolômica emerge, sendo capaz de investigar mudanças no metabolismo de organismos sob diferentes influências genéticas, e/ou patológicas. Nesse estudo, buscamos compreender, por meio da análise de perfis metabólicos e seu espaço químico a eles associado, a resposta de fármaco no organismo-alvo biológico, identificando potencialmente alterações em rotas metabólicas associadas ao patógeno. Como estudo piloto, investigamos como o perfil metabólico de *L. amazonensis* foi alterado com a presença de miltefosina, por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os resultados revelaram perfis metabólicos distintos para cada tratamento, sugerindo que essa abordagem é importante para o entendimento de mudanças específicas no metabolismo do parasita e para a compreensão de possíveis rotas envolvidas no mecanismo de ação do fármaco.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*; metabolômica; miltefosina; parasita.

ABSTRACT

According to the World Health Organization, leishmaniasis is classified among the neglected tropical diseases, together with Chagas disease, malaria, dengue, tuberculosis and leprosy, affecting more than 1 billion people worldwide. It is present in more than 99 countries, mainly in tropical, subtropical and Mediterranean regions, and has a disproportionate impact on the health of economically disadvantaged populations. In clinical practice, leishmaniasis is mainly treated with pentavalent antimonials, amphotericin B (including liposomal formulations), pentamidine and, more recently, miltefosine, the first orally available drug approved for the disease; however, its use is still limited by adverse effects and the emergence of resistant strains. Furthermore, the physiopathological mechanisms of leishmaniasis remain poorly understood at the molecular level, which hampers both drug discovery and the clarification of drug mechanisms of action. In this context, metabolomics has emerged as a powerful tool to investigate changes in the metabolism of organisms under different genetic and/or pathological influences. In this study, we aimed to understand, through the analysis of metabolic profiles and their associated chemical space, how a drug perturbs its biological target, potentially revealing alterations in metabolic pathways associated with the pathogen. In this pilot investigation, we evaluated how the metabolic profile of *L. amazonensis* is altered in the presence of miltefosine using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The results revealed distinct metabolic profiles for each treatment, suggesting that metabolomics is an important tool for elucidating specific changes in parasite metabolism and for advancing the understanding of the possible pathways involved in the drug's mechanism of action.

Keywords: leishmania amazonensis; metabolomics; miltefosine; parasite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Protozoário <i>Leishmania enriettii</i>	16
Figura 2 – Forma Amastigota <i>Leishmania</i> sp	20
Figura 3 – Forma promastigota <i>Leishmania</i> sp	20
Figura 4 – Subgêneros e espécies de <i>Leishmania</i>	21
Figura 5 – Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	22
Figura 6 – Curva de inibição de <i>Leishmania amazonensis</i> tratada com Miltefosina	32
Figura 7 – Biplot PLS-DA	33
Figura 8 – Metabólitos intracelulares de promastigotas de <i>Leishmania</i> expostas a baixas e altas doses de miltefosina	35
Figura 9 – Correlações de Spearman dos níveis de metabólitos em resposta ao tratamento com doses do fármaco miltefosina	38
Figura 10 – Correlação de Spearman dos níveis de Gly-Val-Leu em resposta ao tratamento com doses do fármaco miltefosina	39
Figura 11 – Correlações de Spearman dos níveis de metabólitos em resposta ao tratamento com doses do fármaco miltefosina	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esboço geral da metodologia para estudos metabolômicos de protozoários parasitos em cultura de células	25
Tabela 2 – Distribuição das amostras e controles em placa de 96 poços	28
Tabela 3 – Tabela de diluição	28
Tabela 4 – Correlação de Spearman dos compostos anotados em amostras endocelulares em resposta ao aumento da dose de miltefosina	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE-MS	Eletofórese Capilar acoplada à Espectrometria de Massas
DKP	Diketopiperazina
EC₅₀	Concentração Efetiva 50% (Effective Concentration 50%)
ELISA	Ensaio imunoenzimático ligado à enzima (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI⁺	Ionização por Electrospray em modo positivo (Electrospray Ionization, positive mode)
FBMN	<i>Rede molecular baseada em características (Feature-Based Molecular Networking)</i>
FDA	<i>Administração de Alimentos e Medicamentos (Food and Drug Administration)</i>
GC-MS	<i>Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas</i>
LC	<i>Leishmaniose Cutânea</i>
LC-MS	<i>Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas</i>
LV	<i>Leishmaniose Visceral</i>
MTT	<i>Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)</i>
NMR	<i>Ressonância Magnética Nuclear</i>
PLS-DA	<i>Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (Partial Least Squares Discriminant Analysis)</i>
Q-TOF	<i>Quadrupolo Tempo de Voo (Quadrupole Time of Flight)</i>
UPLC	<i>Cromatografia Líquida de Ultra Performance (Ultra Performance Liquid Chromatography)</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	DESENVOLVIMENTO.....	18
2.1	TRATAMENTOS	23
2.2	METODOLOGIA METABOLÔMICA	24
3	OBJETIVOS E METODOLOGIA.....	27
3.1	EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	29
3.1.1	Preparo do Solvente de Extração	29
3.1.2	Coleta e Fracionamento da Cultura de Leishmania	29
3.1.3	Limpeza das Amostras e Preparação para Análise por LC–MS	30
3.1.4	Parâmetros de Aquisição de Dados por LC–MS	30
3.1.5	Anotação de Metabólitos	31
3.1.6	Análise espectrométrica por HPLC-MS	Erro! Indicador não definido.
3.1.7	Resultados de bioensaios de MTT	31
3.2	RESPOSTA METABÓLICA INTRACELULAR DE LEISHMANIA AO ESTRESSE INDUZIDO PELA MILTEFOSINA	33
4	CONCLUSÃO.....	41
5	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses correspondem a um grupo de doenças infecciosas causadas por parasitas pertencentes à família Trypanosomatidae, transmitidos pela picada de flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito-palha, infectado pelo protozoário do gênero *Leishmania* (Figura 1). Ainda é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando predominantemente indivíduos de nível socioeconômico mais baixo, principalmente em países em desenvolvimento: 350 milhões de pessoas são consideradas em risco de contrair leishmaniose e aproximadamente 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente. Estima-se que cause a nona maior carga de doenças entre as doenças infecciosas individuais (Bern, 2012). Depois da malária, a leishmaniose é conhecida por ser a doença parasitária mais mortal do mundo.

As leishmanioses são principalmente doenças zoonóticas, e uma variedade de mamíferos atua como reservatórios de espécies de *Leishmania*. Especificamente, roedores, edentados e marsupiais normalmente abrigam leishmaniose cutânea, enquanto caninos selvagens e cães domésticos são os principais reservatórios de leishmanioses viscerais zoonóticas. Em hospedeiros humanos, os desfechos da doença são determinados por uma combinação de propriedades parasitárias (espécies dermatrópicas versus viscerotrópicas) e fatores do hospedeiro, como variabilidade genética e respostas imunes à infecção (Dedet, Murray).

Figura 1– Protozoário *Leishmania enriettii*.



Fonte: Seblova *et al.* (2015)

O homem é o hospedeiro acidental da leishmaniose devido à expansão das áreas urbanas sobre as regiões de mata, já que os hospedeiros selvagens são canídeos, roedores e pequenos mamíferos herbívoros, como os coelhos e lebres (lagomorfos). Esses hospedeiros vertebrados são contaminados durante o repasto sanguíneo de insetos vetores, ocorrendo assim a inoculação em vias periféricas de formas infectivas desse parasita, promastigotas metacíclicas. Essas formas são fagocitadas por células polimorfonucleares e passam a existir na forma amastigota, aflagelada e reprodutiva, no interior de fagolisossomos. Uma vez que o hospedeiro infectado é novamente picado as amastigotas são ingeridas e se diferenciam em formas infectivas contemplando assim o seu ciclo de vida. (Nascimento, L. M, 2012).

A eficácia do tratamento é altamente dependente de fatores tanto do parasita quanto do hospedeiro, e outros complicadores incluem a baixa eficácia, longa duração, e efeitos colaterais severos que contribuem com baixa adesão aos tratamentos (Frézard; Demicheli; Ribeiro, 2009). Os fármacos disponíveis tem longo período de tratamento: anfotericina B, eficiente, porém muito tóxica, (Kobets; Grekov; Lipoldova, 2012); pentamidina, muito tóxica e de eficácia variável (Singh; Kumar, 2012); e antimoniais pentavalentes, o único de administração oral sendo a miltefosina, porém apresenta potencial teratogênico (Bhandari et al., 2012). Apesar de estarem no

mercado por décadas, esses fármacos ainda não possuem mecanismo de ação totalmente conhecido (Creek; Barret, 2014).

Para lidar com os complexos desafios envolvidos, este trabalho propõe o uso de abordagens metabolômicas para investigar promastigotas de *Leishmania amazonensis* após o tratamento com o fármaco comercial miltefosina. Ao examinar as alterações nos perfis metabólicos dos patógenos, e entender como uma droga interage com seu organismo-alvo em nível químico. Os resultados contribuem para o avanço do conhecimento metabólico dessa espécie de *Leishmania* e dos mecanismos de ação de substâncias bioativas, considerando que a metabolômica permite uma visão sistêmica das respostas metabólicas ao tratamento com medicamentos, proporcionando uma compreensão mais completa da biologia do patógeno e de sua adaptação a estressores externos, como os fármacos.

2 DESENVOLVIMENTO

A *Leishmania* é de natureza dimórfica, que alterna entre promastigota, forma móvel, no vetor e amastigota, forma imóvel, residente nos hospedeiros humanos infectados (Inceboz, 2019; Torres-Guerrero et al., 2017). Clinicamente, a leishmaniose é capaz de acometer diferentes tipos de tecidos dependendo da espécie envolvida, existem 7 espécies de *Leishmania* que causam as 3 principais formas da doença encontradas em humanos: a leishmania cutânea, a mucocutânea e a visceral e a gravidade da doença dependem tanto das espécies envolvidas quanto da imunidade do hospedeiro. A manifestação clínica de cada um difere no grau de gravidade entre elas, a visceral é a mais fatal com maior taxa de mortalidade (Burza et al., 2019).

Entre as doenças parasitárias, a leishmaniose é responsável pela segunda maior carga de doença depois da malária: 2.357.000 anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs). Existem 350 milhões de pessoas em 98 países em risco de contrair a doença (Geneva) entre 700.000 e 1,2 milhão de casos de LC e entre 200.000 e 400.000 casos de LV ocorrem anualmente em todo o mundo. A falta de sistemas de vigilância eficazes, no entanto, torna difícil determinar a verdadeira carga da doença (Alvar J.).

A leishmaniose visceral, causada pelas espécies *L. donovani*, prevalente no sul da Ásia e na África Oriental, e *L. infantum*, prevalente na região do Mediterrâneo e na América Latina, acometem órgãos como a medula óssea, fígado e baço, pertencentes ao sistema retículo endotelial, ocorrendo a redução da atividade da medula óssea e consequente destruição celular no baço gerando infecções secundárias e sangramentos devido a ocorrência de anemia, leucopenia e trombocitopenia.

A doença pode durar de meses a anos, levando a quadros graves devido à ocorrência de anemia, leucopenia e trombocitopenia, com desenvolvimento de sangramento gastrointestinal e infecções secundárias. Os sintomas iniciais são febre, fraqueza e emagrecimento, havendo também o aumento do baço e hiperpigmentação cutânea em pacientes de pele claras. (Levinson, 2016). A leishmaniose visceral é uma doença crônica sistêmica que, se não for tratada, pode levar a um quadro séptico e morte em 90% dos casos (BRASIL, 2017).

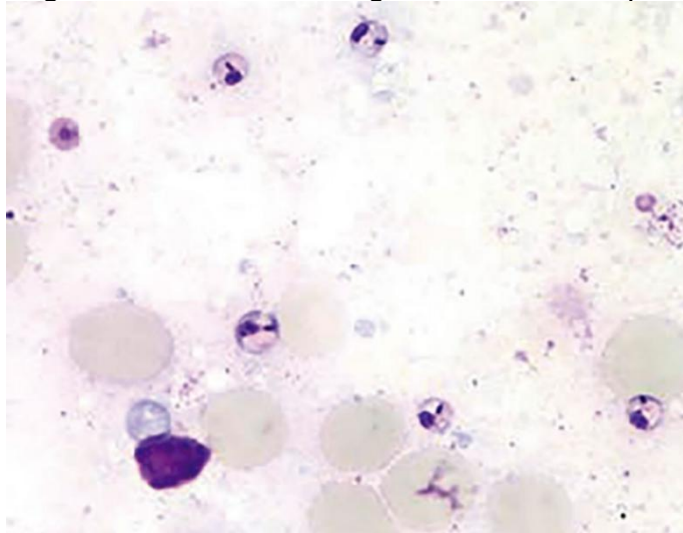
Leishmaniose mucocutânea é causada pela espécie *L. braziliensis* e acomete a pele e as mucosas. Inicia-se com uma lesão no local da picada do mosquito ocorrendo a propagação das lesões cutâneas primárias para sítios mucosos e se desenvolve em lesões metastáticas com aspecto granulomatoso. A cicatrização dessas lesões é muito lenta, e a doença pode ser fatal por infecções secundárias (Levinson, 2016) que tendem a se localizar-se na junção mucocutânea do nariz e da boca e na garganta e evoluem a ponto de destruir a cartilagem nasal tendo sintomas que podem variar de sensação de entupimento, sangramento, coriza, aparecimento de crostas e feridas. Se as lesões atingirem a garganta, os sintomas são tosse, rouquidão e dor ao engolir (BRASIL, 2019).

A leishmaniose cutânea tem uma distribuição geográfica mais ampla. Os cinco países mais afetados são Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã e Síria (Alvar J.). É causada por *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. amazonensis*, sendo caracterizada por causar lesões na pele que curam espontaneamente deixando uma cicatriz. A lesão cutânea inicial ocorre no local da picada do mosquito, formando vários nódulos ao redor e úlceras que são tipicamente indolores e normalmente não provocam sintomas sistêmicos; geralmente estão localizadas em superfícies corporais mais expostas, como pernas e braços. (Levinson, 2016). De forma geral, as lesões cicatrizam espontaneamente após meses, mas podem persistir durante anos, ficando uma cicatriz idêntica à de uma queimadura (Pearson, 2017). Existem inúmeras espécies causadoras de LC, que diferem na distribuição geográfica, apresentação clínica, risco associado de complicações e resposta ao tratamento.

O estudo utilizou promastigotas da cepa (MPRO/BR/1972/M1841-LV-79), parasita *L. amazonensis*, é um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar humana e apresenta um amplo espectro de doenças clínicas (Barral et al., 1991). Entre as espécies causadoras de leishmanioses tegumentares no Brasil, dados recentes indicam que 8% são atribuídas a essa espécie (Camara Coelho).

Durante o seu ciclo de vida, a leishmania apresenta formas evolutivas distintas (Zeibig, 2014) os flebotomíneos transmitem formas promastigotas, do parasita, encontradas em seu intestino, para o hospedeiro mamífero, onde invadem macrófagos e se transformam em amastigotas (Basselin; Coombs; Barrett, 2000).

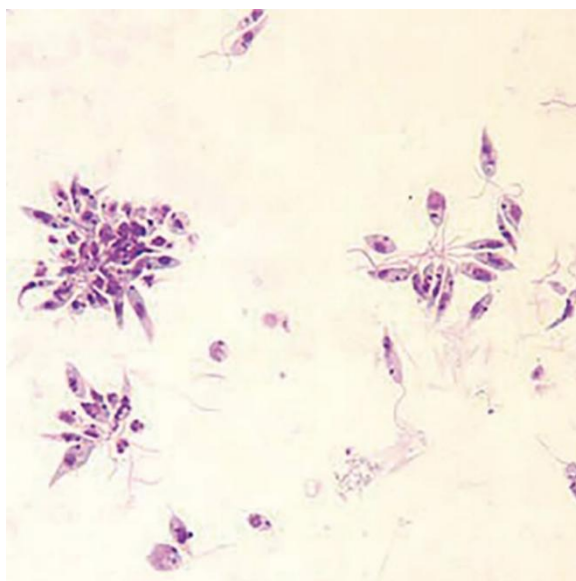
Figura 2 – Forma Amastigota *Leishmania* sp



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2017.

A forma amastigota, pode ser vista no hospedeiro humano em exames microscópicos de amostras teciduais coradas por Giemse e hematoxilina e eosina. Apresentam formato ovoide, medindo de 1 a 5 μm de comprimento por 1 a 2 μm de largura. Elas possuem um núcleo grande, um cinetoplasto proeminente e um axonema curto, o qual é raramente visível por microscopia. Os parasitas residem no interior de macrófagos do hospedeiro e podem ser encontrados em diferentes tecidos do organismo.

Figura 3 – Forma promastigota *Leishmania* sp.

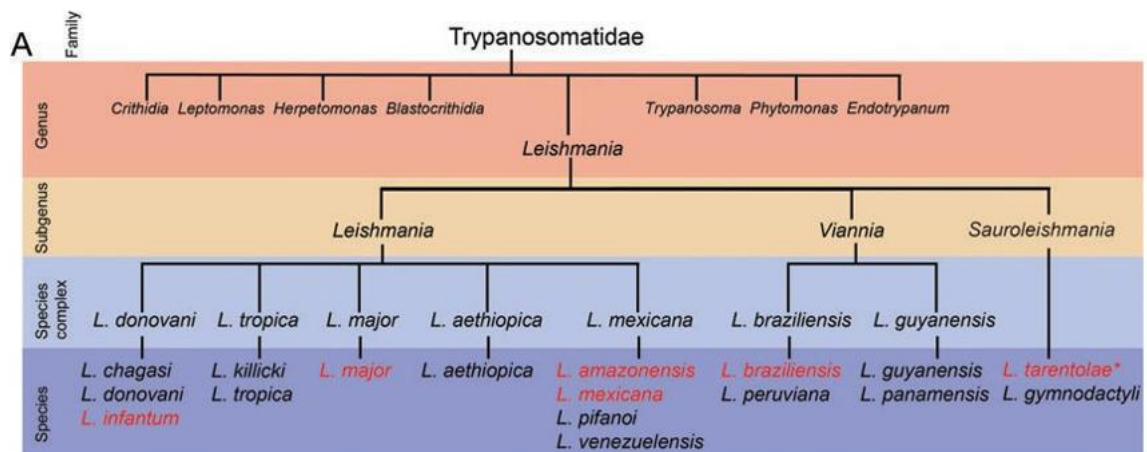


Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2017.

A promastigota pode ser identificada em amostras de cultura por meio de microscopia, uma vez que não é encontrada em tecidos humanos. Apresentam morfologia alongada e delgada, com dimensões variando entre 10 e 12 µm de comprimento. Possuem um núcleo central volumoso e um cinetoplasto localizado próximo à extremidade anterior. O flagelo é livre e frequentemente é maior do que o corpo da promastigota (De carli, 2007).

Na literatura, há uma classificação de Lainson e Shaw (Lainson) que subdivide o gênero *Leishmania* em dois subgêneros com base na localização de promastigotos no trato alimentar do inseto. O subgênero *Leishmania* compreende espécies limitadas ao intestino médio e anterior do flebotomíneo, enquanto o subgênero *Viannia* inclui espécies que desenvolvem uma fase prolongada no intestino posterior com posterior migração de flagelados para o intestino médio e anterior do trato alimentar do vetor. Mais recentemente, um terceiro subgênero foi incluído na classificação de *Leishmania*, o subgênero *Sauroleishmania*, que compreende espécies que parasitam exclusivamente lagartos (Bates). Uma classificação resumida dos subgêneros e espécies de *Leishmania*, associada à diversidade de manifestações clínicas da leishmaniose, incluindo as formas cutânea, mucocutânea e visceral, é apresentada na Figura 4.

Figura 4 - Subgêneros e espécies de *Leishmania*

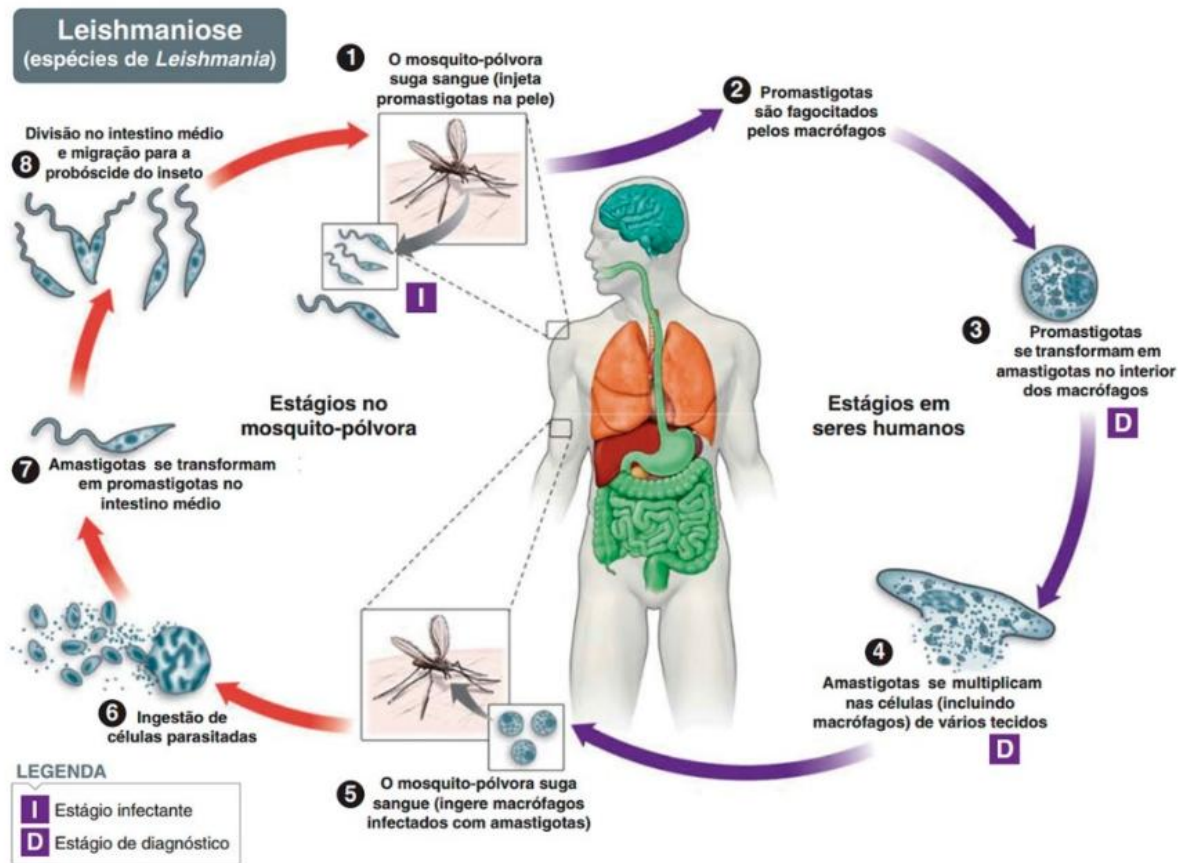


Fonte: F. Real et al, 2009.

Visão geral do complexo *Leishmania mexicana*. (A) Classificação do gênero, subgênero e complexo de espécies de *Leishmania* (adaptado dos relatórios da OMS e Bates, 2007). *L. amazonensis* e *L. mexicana* pertencem ao complexo *L. mexicana*, subgênero *Leishmania*, e são agentes causadores da leishmaniose tegumentar do Novo Mundo, na qual lesões difusas ou disseminadas são

características. Os genomas das espécies marcadas em vermelho foram empregados nas presentes análises comparativas.

Figura 5 – Ciclo de vida da Leishmania



Fonte: Levinson, 2016.

Durante a picada infectante, o vetor inocula promastigotas flageladas na pele do hospedeiro, que são fagocitadas por macrófagos; no interior dessas células, as promastigotas transformam-se em amastigotas, formas intracelulares que se multiplicam em diferentes tecidos. Ao picar um indivíduo infectado, o mosquito ingere macrófagos contendo amastigotas; no intestino médio do inseto, esses amastigotas liberam-se, transformam-se novamente em promastigotas, multiplicam-se, migram para a probóscide e tornam-se aptos a infectar um novo hospedeiro, completando o ciclo.

2.1 Tratamentos

O tratamento das leishmanioses apresenta variações em função da espécie de *Leishmania* envolvida e da região geográfica da infecção. Atualmente, não existem vacinas eficazes disponíveis para a prevenção da Leishmaniose e a terapia depende de antiprotozoários, onde a maioria deles pode ter alta toxicidade, alto custo, longa duração, efeitos colaterais e baixa eficácia ao tratamento devido a fatores tanto do parasita quanto do hospedeiro contribuindo com a baixa adesão aos tratamentos receitados (Frézard; Demicheli; Ribeiro, 2009). Além disso, muitos medicamentos antiprotozoários agem por mecanismos desconhecidos, o que prejudica severamente a utilização clínica ideal deles e sua toxicidade e resistência. Por essas razões, o desenvolvimento de novos medicamentos para a leishmaniose tornou-se uma prioridade e várias novas drogas foram introduzidas.

Após o diagnóstico adequado de infecção, a quimioterapia anti-leishmania atual inclui fármacos como a anfotericina B, eficiente, porém muito tóxica (Kobets; Grekov; Lipoldova, 2012). Foi o primeiro medicamento aprovado para o tratamento da leishmaniose visceral pela FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de qualquer leishmaniose visceral; pentamidina, primeiro medicamento oral, muito tóxica e de eficiência questionável por ter o modo de ação contra parasitas ainda não ser compreendido (Singh; Kumar; Singh, 2012), e miltefosina, eficiente, porém relativamente caro, com tratamento de longa duração e associado à altas taxas de reincidência (Bhandari *et al.*, 2012), sendo ele o primeiro e único leishmanicida disponível por via oral, disponível após ter sido desenvolvido pela primeira vez como agente antineoplásico. Foi licenciado por 10 anos na Índia para o tratamento da leishmaniose visceral e pode ser usado para tratar doenças cutâneas (Dorlo *et al.*, 2012).

No entanto, o tratamento da infecção por leishmaniose continua sendo um desafio global devido a problemas graves como efeitos colaterais, toxicidade, arsenal terapêutico reduzido e resistência a medicamentos (Mandal *et al.*, 2017; Ponte-Sucre *et al.*, 2017). O padrão-ouro para o diagnóstico da leishmaniose consiste na demonstração do parasita em exames realizados por microscopia. Os testes mais comuns são o ensaio de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), teste de imunofluorescência indireta, teste de aglutinação direta e teste de aglutinação em látex (Sarkari; Rezaei; Mohebalí, 2018), mas são técnicas que podem apresentar certas limitações por serem invasivas, consumirem tempo, requerem equipamentos

caros e técnicos especializados, além de que muitos medicamentos antiprotozoários comumente usados agem por mecanismos desconhecidos, o que prejudica a sua utilização clínica ideal e evidencia a necessidade de novas técnicas complementares de diagnóstico (Zare et al., 2022), assim, para combater a falha do tratamento globalmente, é necessário explorar diferentes novas estratégias e tratamentos alternativos.

Para lidar com os complexos desafios apresentados, o trabalho propõe fazer uso da metabolômica, uma abordagem emergente que fornece uma visão geral não direcionada do metabolismo celular pela detecção simultânea e quantificação relativa de centenas de pequenas moléculas, como lipídeos e peptídeos presentes em um sistema biológico. Em outras palavras, a metabolômica é uma caixa de ferramentas usada para examinar as diferenças nas concentrações de metabólitos entre diferentes conjuntos de amostras, que necessita de uma plataforma analítica de alta resolução e alto rendimento, capaz de resolver e quantificar centenas, senão milhares, de pequenas moléculas biológicas coletadas a partir de materiais biológicos apropriados. A análise metabolômica de leishmaniose com o tratamento de compostos antiprotozoários pode potencialmente detectar alterações metabólicas induzidas por drogas no metabolismo do parasita, bem como a identificação de metabólitos e vias metabólicas diretamente afetadas. Isso fornece um método rápido e imparcial para descobrir prováveis alvos de drogas (Beyoğlu e Idle, 2013).

2.2 Metodologia Metabolômica

Os estudos metabolômicas se enquadram em duas grandes categorias, direcionados e não direcionados. Estudos direcionados envolvem experimentos baseados em hipóteses que visam fornecer quantificação precisa de um subconjunto de metabólitos conhecidos, geralmente restritos a uma determinada via metabólica ou classe química. Estudos não direcionados, por outro lado, são geralmente experiências geradoras de hipóteses que fornecem quantificação relativa de todos os sinais de metabólitos detectáveis, com subsequente identificação dos metabólitos mais significativos (Dunn et al. 2012). A principal vantagem da metabolômica não direcionada é a capacidade de identificar uma resposta mediada por drogas no nível bioquímico sem conhecimento prévio do modo de ação de um composto antiprotozoário específico. Este método pode ser usado para classificar os compostos de acordo com seu modo de ação com base em uma assinatura metabólica e, em

muitos casos, destacar a enzima metabólica específica ou a via responsável pela atividade antiprotzoária.

Para a preparação das amostras, as medições das respostas metabólicas aos medicamentos são frequentemente obtidas a partir de sistemas de cultura de células *in vitro*. Essa abordagem permite o máximo controle sobre variáveis genéticas e ambientais, como temperatura, pH, atmosfera, ambiente extracelular e densidade celular, que podem contribuir para alterações metabólicas indesejadas e obscurecer a observação desejada de efeitos específicos de drogas (Cuperlovic-Culf et al. 2010).

Tabela 1 - Esboço geral da metodologia para estudos metabolômicos de protozoários parasitos em cultura de células.

Etapas	Subetapas / Ações	Descrição
1.Preparação da amostra	Incubar cultura do parasita com o composto teste	O parasita é cultivado em presença do composto a ser avaliado
	Interrupção do metabolismo (<i>Quench metabolism</i>)	O metabolismo é rapidamente interrompido para preservar o estado metabólico no momento da coleta.
	Purificação das células do parasita	As células parasitárias são isoladas do meio de cultura e impurezas
	Extração de metabólitos	Os metabólitos intracelulares são extraídos para análise
	LC-MS*	Técnica usada para separar e identificar compostos químicos em solução
2.Análise da amostra	GC-MS**	Técnica utilizada para compostos voláteis e termicamente estáveis

	CE-MS***	Usada para analisar metabólitos polares e carregados
	NMR****	Técnica complementar para identificar e quantificar metabólitos
3.Análise dos dados	Extração de características e alinhamento de amostras	Identificação dos picos de metabólitos e alinhamento entre as amostras analisadas
	Filtragem de ruído e análise estatística	Remoção de sinais irrelevantes e análise dos dados estatisticamente significativos
	Identificação de metabólitos	Determinação dos compostos presentes com base em bancos de dados e espectros
	Interpretação bioquímica/farmacológica	Integração dos resultados para compreender as alterações metabólicas e efeitos do composto

Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

*Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas; **Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas; ***Eletroforese Capilar acoplada à Espectrometria de Massas; ****Ressonância Magnética Nuclear

A escolha do meio de cultura pode interferir na ação do fármaco e/ou nas respostas metabólicas, especialmente quando um meio de cultura padrão não mimetiza o ambiente in vivo do parasita, sugerindo que os meios de cultura devem ser modificados para refletir mais de perto as condições in vivo sempre que possível (Vincent *et al.* 2012).

A análise metabolômica geralmente é realizada com espectrometria de massa ou espectroscopia de RMN. A espectrometria de massa é geralmente acoplada à separação cromatográfica, como cromatografia gasosa (GC-MS), eletroforese capilar (CE-MS) ou cromatografia líquida (LC-MS) (Dunn et al. 2005; Scalbert et al. 2009; Scheltema et al. 2010; Creek et al. 2012a), essa última sendo a mais utilizada devido à sua alta sensibilidade, ampla especificidade e capacidade de anotar ou identificar centenas de metabólitos polares e apolares de uma ampla gama de classes metabólicas (Theodoridis et al. 2012).

3 **Objetivos e metodologia**

Para a preparação da amostra, foi necessária uma boa adaptação das *Leishmania* ao meio e em condições fisiológicas estáveis, garantindo a obtenção de parasitos viáveis e metabolicamente ativos para os testes.

Os promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram cultivados em meio LIT por 7 dias, até atingirem a fase logarítmica intermediária. A densidade parasitária foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer e ajustada para 1×10^7 parasitos mL^{-1} . Um volume total de 97 μL da cultura ajustada foi dispensado em cada poço de uma placa de 96 poços, seguido pela adição de 3 μL da solução do fármaco diluída em série (miltefosina ou pentamidina), resultando em concentrações finais variando de 100 μM a 1,56 μM . Os poços-controle receberam parasitos sem fármaco (controle positivo) ou diluição do fármaco em meio LIT sem parasitos (controles em branco).

***Leishmania amazonensis* (L.a.)**

- Concentração: 1×10^7 células/mL
- Meio de cultura: Liver Infusion Trypsose (LIT), fornecendo nutrientes para o crescimento de *Leishmania*
- Incubação: 72 horas a 25°C

Tabela 2 - Distribuição das amostras e controles em placa de 96 poços

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	97 μ L Leishmania + 3 μ L composto 1			97 μ L meio LIT + 3 μ L composto 1			97 μ L Leishmania + 3 μ L composto 2			97 μ L meio LIT + 3 μ L composto 2		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	Controle 100 μ L Leish			Controle 100 μ L meio			Controle 100 μ L Leish			Controle 100 μ L meio		

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

A placa de 96 poços permite testar múltiplas amostras e concentrações em paralelo, economizando tempo e reagentes.

Em seguida, as diluições dos fármacos foram preparadas em uma placa de 96 poços separada, utilizando um esquema de diluição seriada 1:2, partindo da concentração de 100 μ M. As placas foram incubadas a 27 °C por 72 horas em uma estufa tipo BOD. Após a incubação, foram adicionados 10 μ L de uma solução de MTT/PMS (MTT a 2,5 mg mL⁻¹ em água Milli-Q e PMS a 5,5 mg mL⁻¹) em cada poço, e as placas foram novamente incubadas no escuro a 27 °C por 75 minutos. O produto formazana formado foi solubilizado pela adição sequencial de 100 μ L de etanol, seguida de 100 μ L de uma solução isopropanol:PBS (1:1) em cada poço. A absorbância foi então mensurada a 570 nm utilizando um leitor de microplacas TECAN.

Tabela 3 - Tabela de diluição

	Quantidade de meio	Compostos	Conc. final
A	80 μ L	20 μ L	100 uM
B	50 μ L	50 μ L	50 uM
C	50 μ L	50 μ L	25 uM
D	50 μ L	50 μ L	12,5 uM
E	50 μ L	50 μ L	6,25 uM

F	50 μ L	50 μ L	3,125 μ M
G	50 μ L	50 μ L	1,56 μ M
H	Células, sem tratamento		

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

A porcentagem de inibição do crescimento parasitário foi calculada com base nos valores de absorbância dos controles.

Devido à limitação de material, o experimento foi adaptado do delineamento inicial em triplicata para duplicata, sendo que o terceiro poço de cada condição foi coletado antes da adição do MTT e processado para análise metabolômica baseada em LC–MS. Esses extratos foram posteriormente utilizados para o perfil metabolômico não direcionado, servindo como base analítica para a interpretação subsequente dos dados.

3.1 Extração de Metabólitos e Preparação de Amostras

3.1.1 Preparo do Solvente de Extração

Um solvente de extração composto por metanol, clorofórmio e água na proporção de 7:2:1 (v/v/v) foi preparado e mantido a -20°C antes do uso, a fim de garantir a eficiência consistente da extração.

3.1.2 Coleta e Fracionamento da Cultura de Leishmania

As culturas contendo parasitos de *Leishmania* foram coletadas integralmente dos poços individuais e transferidas para microtubos de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas a 20.000 rpm por 5 minutos a 4°C para separar as frações extracelular e intracelular. Os sobrenadantes resultantes, correspondentes ao metaboloma extracelular, foram cuidadosamente transferidos para novos tubos e armazenados a -80°C até a liofilização. Os extratos liofilizados foram mantidos a 4°C para o processamento subsequente.

Os pellets celulares foram ressuspensos em 500 μ L do solvente de extração previamente resfriado, homogeneizados em vortex por 30 segundos e centrifugados novamente nas mesmas condições. Os sobrenadantes obtidos, correspondentes aos metabólitos intracelulares, foram coletados e secos sob um fluxo

suave de ar dentro de uma capela de exaustão. Os extratos intracelulares secos foram armazenados a 4 °C até a etapa de purificação subsequente.

3.1.3 *Clean-up* das Amostras e Preparação para Análise por LC–MS

Os extratos intracelulares foram submetidos à extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Sep-Pak C18, com o objetivo de remover componentes altamente apolares ou interferentes da matriz. Os metabólitos foram eluídos com metanol a 95% em água (v/v), e os eluatos foram completamente secos e armazenados a 4 °C.

Antes da análise, os extratos secos foram reconstituídos em 60 µL de acetonitrila: água (1:1, v/v) e transferidos para frascos de vidro para UPLC equipados com inserções de baixo volume. Uma alíquota de 10 µL de cada amostra reconstituída foi combinada para gerar uma amostra de controle de qualidade composta, que foi injetada periodicamente ao longo da sequência analítica para monitorar a estabilidade do sinal, variações no tempo de retenção e o desempenho do instrumento.

3.1.4 Parâmetros de Aquisição de Dados por LC–MS

A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna Waters ACQUITY UPLC® BEH HILIC (2,1 × 100 mm, tamanho de partícula 1,7 µm) mantida a 35 °C. O autosampler foi mantido a 5 °C durante toda a análise. A fase móvel consistiu de (A) acetato de amônio 5 mM (pH 3,5) contendo 5% de acetonitrila e (B) acetonitrila. A vazão foi ajustada para 0,3 mL min⁻¹. Todas as amostras foram analisadas como réplicas técnicas.

A separação cromatográfica foi acoplada a um espectrômetro de massa de alta resolução quadrupolo–time-of-flight (Q-TOF) equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) operando nos modos de íon positivo e negativo. A voltagem do capilar foi ajustada para 3,0 kV no modo positivo e 2,5 kV no modo negativo, com uma voltagem de cone de 30 V. A temperatura da fonte foi mantida a 120 °C, e a temperatura do gás de desolvatação a 400 °C. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e desolvatação (fluxo de desolvatação de 800 L h⁻¹).

Os dados de MS em varredura completa foram adquiridos em uma faixa de m/z de 50–1200 Da, com uma taxa de varredura de 0,3 s por espectro. O modo de aquisição empregou detecção de centróide com correção automática de massa

utilizando uma referência de massa fixa (leucina encefalina, $[M+H]^+ = 556,2771$, $[M-H]^- = 554,2615$).

A aquisição de MS/MS dependente de dados foi acionada nos 5 íons precursores mais intensos por varredura, utilizando exclusão dinâmica para minimizar fragmentações repetidas. A dissociação induzida por colisão foi realizada usando argônio como gás de colisão, com uma rampa de energia de colisão de 10–40 eV, otimizada de acordo com o m/z do precursor.

Todos os espectros foram adquiridos usando o MassLynx (Waters) e processados pelo algoritmo de centróide proprietário do fabricante antes da extração de sinais espectrométricos. A detecção de picos, deconvolução e alinhamento foram posteriormente realizadas usando MZmine para a análise metabolômica subsequente.

3.1.5 Anotação de Metabólitos

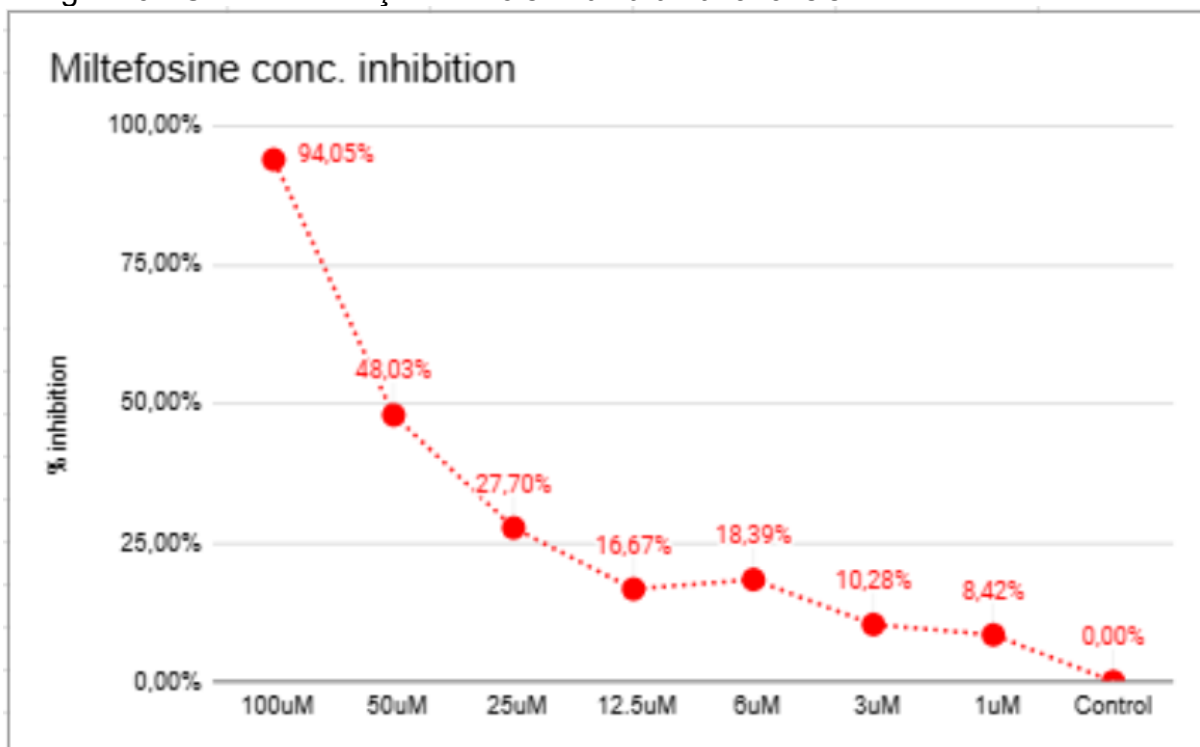
A anotação espectral foi realizada utilizando o fluxo de trabalho Feature-Based Molecular Networking (FBMN) disponível na plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS2, 2016). As tabelas de características de MS/MS alinhadas e normalizadas, juntamente com os arquivos espectrais correspondentes (.mgf), foram submetidos ao módulo FBMN do GNPS2 para geração de rede e correspondência espectral contra as bibliotecas espectrais públicas agregadas, incluindo os bancos de dados GNPS, MassBank, HMDB, MS2LDA e ReSpect.

Todas as anotações automatizadas foram verificadas e validadas manualmente, envolvendo a inspeção visual dos padrões de fragmentação, distribuições isotópicas e comportamento cromatográfico. As identidades putativas dos compostos foram avaliadas quanto à plausibilidade biológica no contexto do metabolismo de *Leishmania* e das condições experimentais. Anotações ambíguas ou quimicamente implausíveis foram excluídas.

3.1.6 Resultados de bioensaios de MTT

Avaliação da viabilidade de *Leishmania amazonensis* frente à Miltefosina pelos ensaios de MTT

Figura 6 - Curva de inibição de *Leishmania amazonensis* tratada com Miltefosina



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

O composto apresentou um perfil de dose-resposta típico, com aumento da inibição do crescimento parasitário conforme o aumento da concentração. A miltefosina apresentou inibição máxima de 94% em 100 μ M, demonstrando um declínio mais gradual na curva de inibição, o que sugere diferenças nos mecanismos de ação ou na penetração celular, processos que podem exigir maior tempo de exposição para alcançar um efeito máximo.

Esse declínio inibitório mais gradual conforme a concentração, difere ligeiramente dos resultados relatados na literatura como por exemplo o trabalho de Neira, L. F. et al, (2025) onde foi demonstrado que cepas de *Leishmania infantum* selecionadas exibem alterações de suscetibilidade à Miltefosina, o que implica variações no perfil de resposta ao fármaco. De forma semelhante, Moraes-Teixeira et al. (2011) observaram que compostos ativos contra *Leishmania amazonensis* apresentaram efeito inibitório mais acentuado em concentrações menores, indicando maior sensibilidade parasitária. Além disso, Cardoso et al. (2018) relataram um valor de EC_{50} de aproximadamente 12,6 μ M para miltefosina em promastigotas de *L. amazonensis*, sugerindo que concentrações relativamente baixas já produzem efeito expressivo.

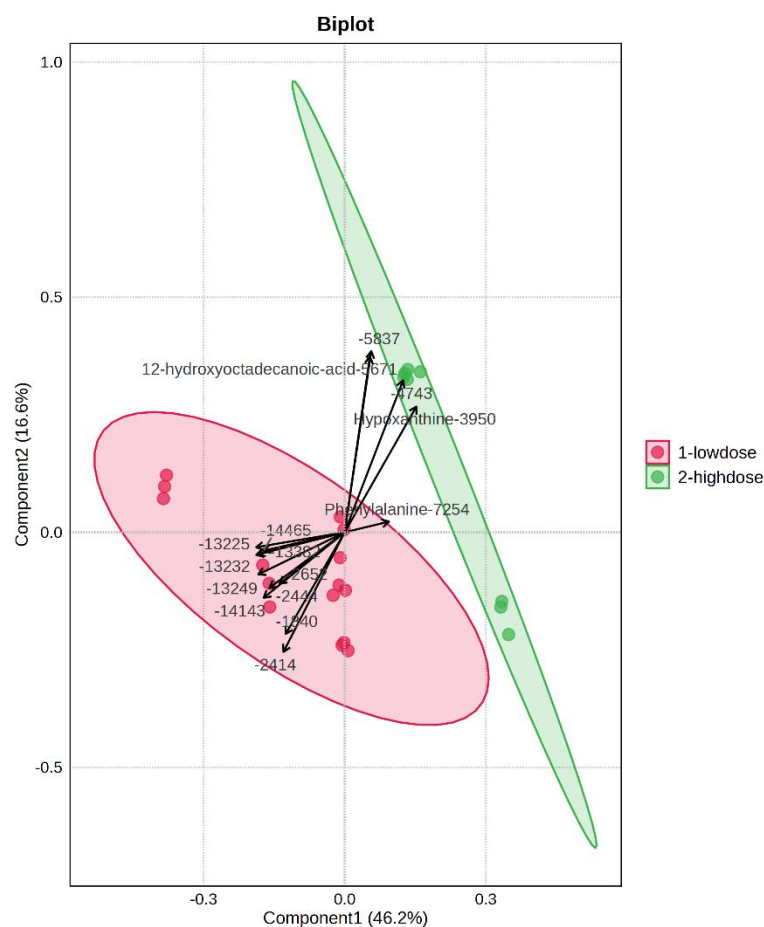
Dado que a literatura mostra atividade relevante em faixas de concentração inferiores, o fato do composto testado requerer 100 μM para alcançar 94% de inibição pode indicar menor uma penetração celular, uma necessidade de maior tempo de exposição ou até mesmo um mecanismo de ação diferente no sistema experimental. Essas hipóteses de são consistentes com as observações de variação de suscetibilidade descritas nos estudos acima.

3.2 Resposta Metabólica Intracelular de Leishmania ao Estresse Induzido pela Miltefosina

1. Visão Geral da PLS-DA e Análise de Volcano Plot

Para explorar a divergência metabólica geral entre *Leishmania* exposta a baixas (1–25 μM) e altas (50–100 μM) concentrações de miltefosina, foi realizada uma Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) (Figura 7). O biplot resultante mostra dois agrupamentos claramente separados, correspondentes aos tratamentos de baixa dose (vermelho) e alta dose (verde). O primeiro componente (Componente 1), explicando 46,2% da variância total, captura a maior parte da separação entre os grupos de dose, enquanto o Componente 2 (12,6%) representa variações secundárias dentro de cada grupo.

Figura 7– Biplot PLS-DA mostrando a separação metabólica entre *Leishmania* exposta a baixas e altas doses de miltefosina



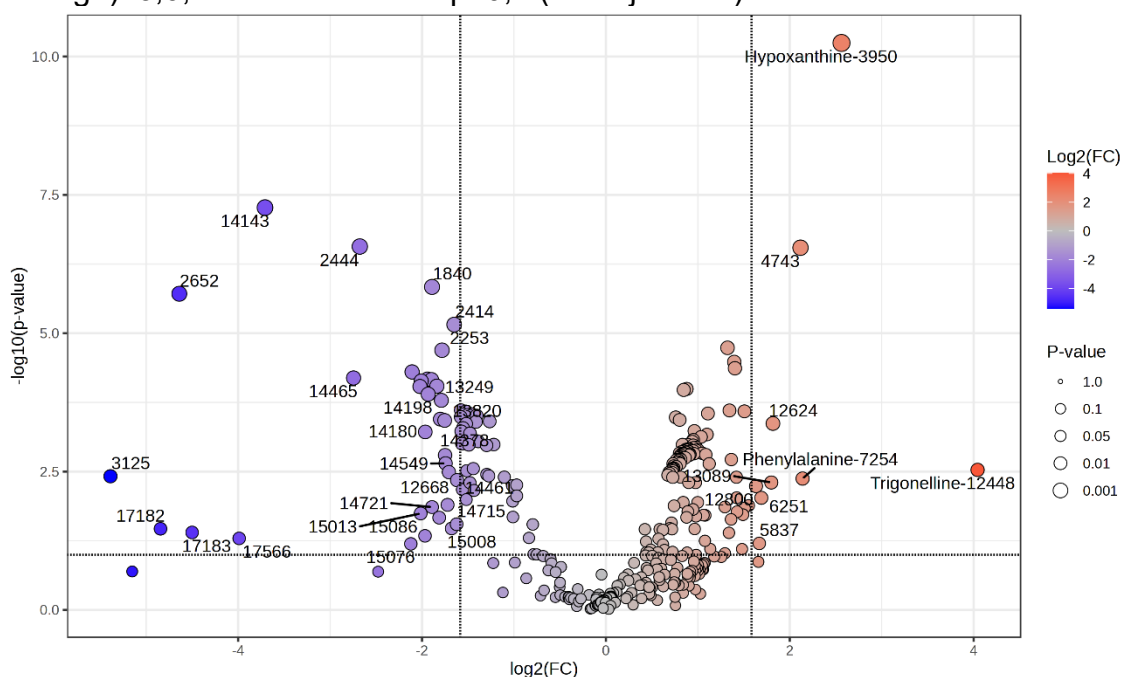
Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

As elipses de confiança de 95% não sobrepostas indicam perfis metabólicos distintos sob exposição a baixas versus altas doses do fármaco, sugerindo um rearranjo metabólico dependente da dose. Os vetores de carga (setas pretas) destacam os metabólitos que mais contribuem para a discriminação entre os grupos. Notavelmente, a fenilalanina apresenta um carregamento forte em direção ao agrupamento de alta dose, indicando aumento da abundância intracelular ou retenção sob maior estresse do fármaco. Em contraste, os metabólitos com vetores mais curtos ou alinhados em direção ao grupo de baixa dose provavelmente refletem respostas basais ou intermediárias adaptativas.

A análise do volcano plot (Figura 6) corrobora esses achados, evidenciando um desbalanceamento claro na regulação dos metabólitos em função da intensidade do fármaco. Vários metabólitos anotados apresentaram alterações significativas de

abundância ($|\log_2FC| > 3$; $p < 0,1$). Notavelmente, hipoxantina, fenilalanina e trigonelina (anotação putativa, derivado metoxilado da niacina) foram significativamente aumentados nas condições de alta dose, sugerindo perturbação nos metabolismos de purinas, aminoácidos e nicotinato sob estresse do fármaco.

Figura 8 - Metabólitos intracelulares de promastigotas de *Leishmania* expostas a baixas (1–25 μ M) e altas (50–100 μ M) doses de miltefosina. Limite de variação (fold change): 3,0; limite de valor de p: 0,1 (não ajustado).



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

2. Análise de Correlação de Spearman

A análise de correlação de Spearman dos metabólitos endocelulares sob diferentes níveis de exposição à miltefosina revelou diversos compostos cujas abundâncias aumentaram proporcionalmente à concentração do fármaco ($FDR < 0,5$). Os metabólitos com correlação mais forte foram pequenos derivados de aminoácidos e osmólitos, destacando-se Gly-Val-Leu, colina, carnitina e glicerofosfocolina. Correlações moderadas também foram observadas para um derivado da niacina e para a hipoxantina, enquanto dipeptídeos cíclicos (por exemplo, ciclo(Phe-Pro)) apresentaram associações positivas mais fracas, porém consistentes (Tabela 4).

Tabela 4 – Tabela de correlação de Spearman dos compostos anotados em amostras endocelulares em resposta ao aumento da dose de miltefosina

Metabólito	Corr. Spearman	FDR	Interpretação biológica tentativa	Referência
Gly-Val-Leu (tripeptídeo)	0.62	0.00	Tri-/di-peptídeos aparecem comumente em metabolomas de parasitos não direcionados e frequentemente refletem proteólise/turnover. Nenhum estudo publicado nomeia especificamente Gly-Val-Leu em Leishmania.	Westrop, G. D, 2025. Canuto, G. A. B, 2014.
Colina	0.57	0.01	As vias de colina/fosfatidilcolina são diretamente afetadas pela miltefosina; alterações intracelulares de colina/GPC são bem documentadas.	González, U. A, 2007. Atan, N. A. D, 2018.
Carnitina	0.57	0.01	Acilcarnitinas/sinais semelhantes à carnitina aparecem em metabolomas de parasitos e podem refletir remodelamento lipídico/energético. Nenhum estudo cita carnitina como marcador principal de Leishmania, mas acilcarnitinas/glicerofosfolipídios aparecem na metabolômica de Leishmania	Wang, L, 2005.
Glicero-3-fosfocolina	0.56	0.01	GPC é um produto solúvel da degradação de fosfatidilcolina — esperado alterar quando a miltefosina perturba o metabolismo de PC.	Rakotomanga, M, 2007. Guarnizo, S. A. G, 2021.
Derivado de Diketopiperazina	0.56	0.01	Níveis de DPK sugerem retenção ou ingestão diferencial de aminoácidos. Não há evidência de formação de DKP induzida por estresse; provavelmente derivado do meio.	Limongi, D, 2018.
*Trigonelina (derivado da niacina)	0.55	0.01	Pode indicar alterações induzidas por estresse no metabolismo de NAD ⁺ . O metabólito é identificado como derivado de niacina (B3), portanto a interpretação biológica é especulativa.	Gazanion, E, 2011. Michels, P. A. M, 2011.
Hipoxantina	0.45	0.06	A reciclagem de purinas é essencial em Leishmania (sem síntese de purinas <i>de novo</i>). A dinâmica hipoxantina/xantina é bem documentada na literatura sobre reciclagem de purinas em Leishmania.	Boitz, J. M, 2012. Boitz, J. M, 2006.

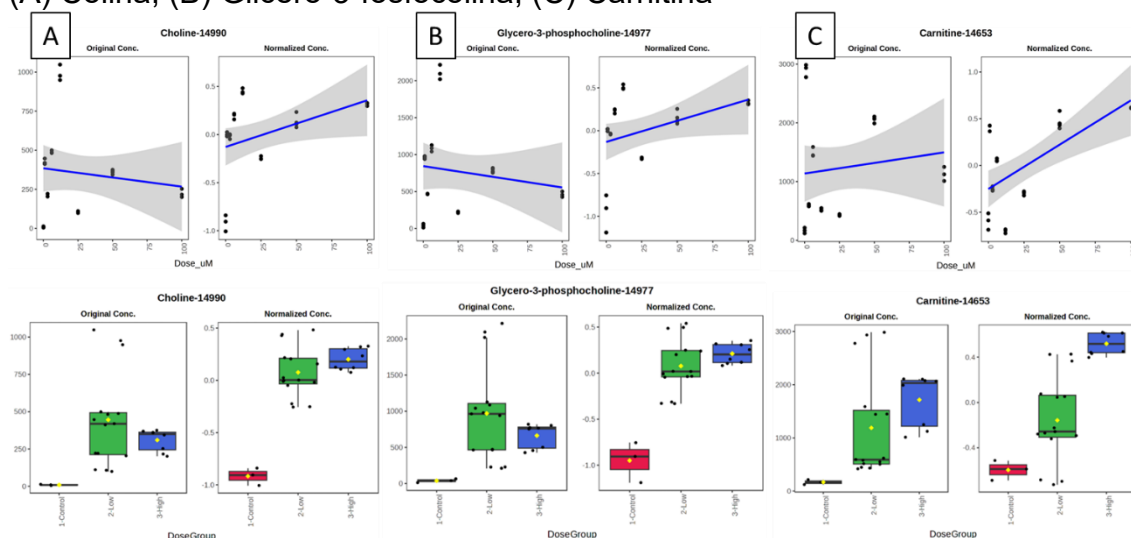
Metabólito	Corr. Spearman	FDR	Interpretação biológica tentativa	Referência
Ciclo(Phe-Pro)	0.41	0.1	Família DKP — ver acima.	
Fenilalanina	0.29	0.27	Captura ou retenção de aminoácidos.	
Ciclo(Pro-Leu)	0.28	0.28	Família DKP — ver acima.	
Ciclo(Gly-Pro)	-0.21	0.45	Família DKP — ver acima.	
Ciclo(His-Phe)	-0.30	0.25	Família DKP — ver acima.	
Ciclo(Pro-Gly)	-0.38	0.13	Família DKP — ver acima.	
Bis-nor-ácido- chenodesoxicólico_estrone	-0.70	0.00	Anotação semelhante a ácidos biliares/conjugado de esterol. Leishmania possui metabolismo de esteróis distinto (derivados de ergosterol/lanosterol) e fármacos alteram a composição de esteróis, mas nenhum estudo cita explicitamente este conjugado de ácido biliar em Leishmania, sendo, portanto, especulativo até validação estrutural.	Feng, M, 2022. Sakyi, P. O, 2021. Xu, W, 2014.

Fonte: Elaborado pelos autores (2025).

A elevação coordenada de colina, glicero-fosfocolina e carnitina (Figura 9 a–c) sugere uma interrupção do metabolismo de fosfolipídios e associado à membrana, consistente com o mecanismo conhecido da miltefosina. Como um alquilfosfocolina com atividade sobre membranas, a miltefosina se integra às bicamadas lipídicas, alterando a fluidez e simetria da membrana e, por fim, afetando o potencial mitocondrial e da membrana plasmática. Essas perturbações podem levar a aumentos compensatórios no catabolismo de fosfatidilcolina, resultando em elevação das reservas de colina livre e glicero-fosfocolina — um fenômeno previamente observado em protozoários e células de mamíferos submetidos a estresse farmacológico (Rakotomanga, 2007; Westrop, 2015; Guarnizo et al., 2021). De forma semelhante, o aumento da carnitina pode refletir estresse mitocondrial e ativação de vias relacionadas ao transporte lipídico ou β -oxidação, à medida que o

parasita tenta gerenciar o desequilíbrio energético e a carga oxidativa (Westrop et al., 2015).

Figura 9 - Correlações de Spearman dos níveis de metabólitos em resposta ao tratamento com doses do fármaco miltefosina. A projeção em box-plot agrupa os níveis do fármaco como controle (sem fármaco), baixa dose (1,562 μ M – 25 μ M, abaixo do IC₅₀ observado) e alta dose (50 μ M e 100 μ M, acima do IC₅₀ observado). (A) Colina; (B) Glicero-3-fosfocolina; (C) Carnitina

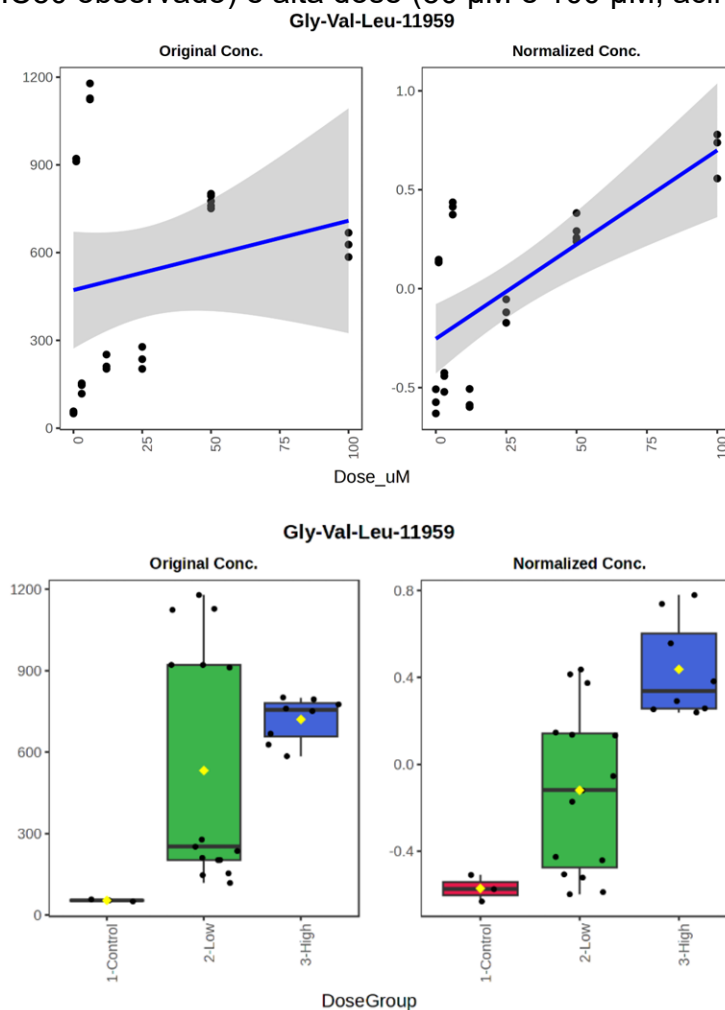


Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

O aumento de Gly-Val-Leu (Figura 8), um peptídeo de cadeia ramificada curta, pode refletir consequências secundárias do turnover proteico e reciclagem de aminoácidos sob estresse. Apoiado por essa interpretação, (Vieira, 1995) demonstrou que a captação de aminoácidos em *Leishmania major* depende em grande parte da manutenção do potencial de membrana (V_m), que impulsiona o transporte ativo de aminoácidos neutros e básicos. A despolarização induzida pela miltefosina comprometeria essa captação, levando a uma redução na acumulação intracelular de aminoácidos livres. O enriquecimento relativo de pequenos peptídeos poderia, portanto, surgir de proteólise incompleta ou de reabsorção prejudicada de fragmentos derivados de aminoácidos, consistente com a redução da atividade dos transportadores. Além disso, vários derivados de diketopiperazina (DKP) foram detectados com correlações positivas modestamente significativas. Embora DKPs tenham sido ocasionalmente associados ao metabolismo secundário microbiano, não há evidências na literatura que suportem a biossíntese de DKPs induzida por estresse em *Leishmania* ou protozoários relacionados. Sua ocorrência neste estudo é, portanto, mais provavelmente explicada pelo resíduo derivado do meio ou por

alterações na captação e retenção de aminoácidos sob estresse do fármaco, refletindo mudanças na disponibilidade de aminoácidos e na eficiência do transporte através da membrana (Aoki, 2017; Marchese, 2018).

Figura 10 - Correlação de Spearman dos níveis de Gly-Val-Leu em resposta ao tratamento com doses do fármaco miltefosina. A projeção em box-plot agrupa os níveis do fármaco como controle (sem fármaco), baixa dose (1,562 μ M – 25 μ M, abaixo do IC50 observado) e alta dose (50 μ M e 100 μ M, acima do IC50 observado).

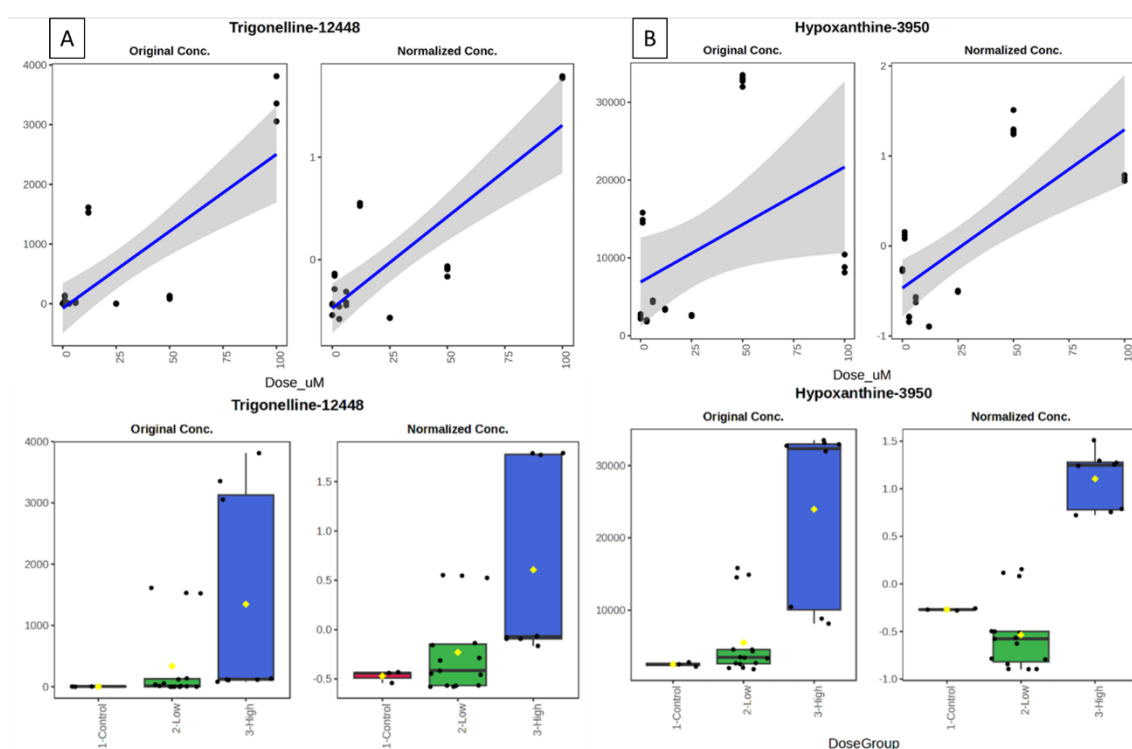


Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

Um metabólito atribuído putativamente como derivado metilado da niacina (vitamina B3) e a **hipoxantina** (Figura 9), um intermediário do reciclagem de purinas, ambos apresentaram correlações positivas moderadas com a dose. A acumulação de hipoxantina pode indicar redução da utilização pela via de reciclagem de purinas, possivelmente refletindo inibição do crescimento e da síntese de DNA, uma vez que *Leishmania* não possui síntese de purinas *de novo* (Boitz; Ullman, 2012). Níveis elevados do derivado de niacina podem sugerir alterações induzidas por estresse no

metabolismo de NAD^+ , já que a metilação da nicotinato tem sido associada ao equilíbrio redox adaptativo e à desintoxicação sob estresse oxidativo (Gazanion, 2011; Michels & Avilán, 2011).

Figura 11 – Correlações de Spearman dos níveis de metabólitos em resposta ao tratamento com doses do fármaco miltefosina. A projeção em box-plot agrupa os níveis do fármaco como controle (sem fármaco), baixa dose (1,562 μM – 25 μM , abaixo do IC_{50} observado) e alta dose (50 μM e 100 μM , acima do IC_{50} observado). (A) Trigonelina (niacina metoxilada); (B) Hipoxantina.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2025.

De forma geral, o perfil metabólico endocelular de *Leishmania* sob estresse induzido pela miltefosina apoia um modelo de disfunção energética e de membrana, caracterizado por catabolismo alterado de fosfolípidios, desregulação de aminoácidos e redução da eficiência metabólica. Ao invés de representar um aumento direto na atividade biossintética, essas acumulações de metabólitos provavelmente refletem respostas compensatórias e passivas à perda do potencial de membrana, dano mitocondrial e à consequente perturbação da homeostase de nutrientes.

4 CONCLUSÃO

Os ensaios biológicos de MTT demonstraram que o fármaco testado é ativo contra o protozoário *Leishmania amazonensis* nas condições testadas. No entanto, observou-se variação nos resultados entre as diferentes concentrações testadas, o que pode estar relacionado a fatores experimentais, que pode ser atribuído a uma combinação de problemas no laboratório úmido, falhas na leitura da microplaca, reagentes defeituosos e o erro nativo esperado para esse tipo de ensaio. Embora o efeito do composto fosse perceptível visualmente nas placas, a quantificação por absorbância não apresentou reprodutibilidade suficiente para uma análise conclusiva.

Quanto aos dados processados por LC-MS, a análise estatística mostrou sinais diferentes como significativos em cada ensaio separado com os compostos. Isso pode indicar que o *L. amazonensis* secreta/excreta diferentes compostos no meio de cultura ao entrar em contato com o fármaco.

Embora ainda seja cedo para interpretar totalmente as implicações dos resultados, este estudo piloto demonstrou com sucesso que as mudanças metabólicas induzidas pelos compostos são significativas o suficiente para serem detectadas usando LC-MS. Essa descoberta justifica a continuidade da pesquisa, sendo necessários testes adicionais para solidificar essas percepções iniciais.

O aumento das replicações permitirá análises de dose-resposta, melhorando a robustez dos dados. Além disso, a conclusão dos conjuntos de dados do perfil metabólico e do perfil metabólico das amostras correspondentes ao perfil extracelular, juntamente com a identificação e caracterização de metabólitos, abrirá caminho para análises de enriquecimento e vias metabólicas, que podem fornecer dados mais profundos sobre a resposta metabólica do protozoário aos compostos.

REFERÊNCIAS

- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, v. 7, n. 5, e35671, 2012.
- AMATO, V.; AMATO, J.; NICODEMO, A.; UIP, D.; AMATO-NETO, V.; DUARTE, M. Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isethionate. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, v. 125, p. 492–495, 1998.
- ATAN, N. A. D.; LIMA, G. M. de; OLIVEIRA, A. G. de et al. Metabolomics-based studies in the field of *Leishmania*: a systematic analysis. *Parasites & Vectors*, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2018.
- BANDHARI, V. et al. Drug susceptibility in *Leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 5, e1657, 2012.
- BASSÉLIN, M.; COOMBS, G. H.; BARRETT, M. P. Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 109, p. 37–46, 2000.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, v. 37, p. 1097–1106, 2007.
- BECKER, I. et al. The efficacy of pentamidine combined with allopurinol in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Parasitology Research*, v. 85, p. 165–170, 1999.
- BEYOĞLU, D.; IDLE, J. R. Metabolomics and its potential in drug development. *Biochemical Pharmacology*, v. 85, p. 12–20, 2013.
- BOITZ, J. M.; ULLMAN, B. A conditional mutant deficient in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and xanthine phosphoribosyltransferase validates the purine salvage pathway of *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 23, p. 16084–16089, 2006.
- BRASIL. *Guia de vigilância em saúde*. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. E-book.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniose – resposta dos autores. *The Lancet*, v. 393, p. 872–873, 2019.
- CAMARA COELHO, L. I. et al. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitology Research*, v. 108, p. 671–677, 2011.
- CANUTO, G. A. B. et al. Multi-analytical platform metabolomic approach to study miltefosine mechanism of action and resistance in *Leishmania*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 406, p. 3459–3476, 2014.

CARDOSO, K. C. F. et al. Effect of phospholipase A₂ inhibitors during infection caused by *Leishmania amazonensis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 24, n. 17, p. 1–12, 2018.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 54, p. 178–184, 1996.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Leishmaniasis*. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 22 jul. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis*. Geneva: WHO, 2010.

CREEK, D. J.; BARRETT, M. P. Determination of antiprotozoal drug mechanisms by metabolomics approaches. *Parasitology*, v. 141, n. 1, p. 83–92, 2014.

CUPERLOVIC-CULF, M. et al. Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discovery Today*, v. 15, p. 610–621, 2010.

DEDET, J. P. et al. Cutaneous leishmaniasis. The parasite. *Clinics in Dermatology*, v. 17, p. 261–268, 1999.

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

DUNN, W. B.; BAILEY, N. J. C.; JOHNSON, H. E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, v. 130, p. 606–625, 2005.

DUNN, W. B. et al. Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, v. 9, p. 44–66, 2013.

FENG, M. et al. Sterol profiling of *Leishmania* parasites using a new HPLC–tandem mass spectrometry-based method and antifungal azoles as chemical probes reveals a key intermediate sterol that supports a branched ergosterol biosynthetic pathway. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 20, p. 27–42, 2022.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.

GAZANION, E. et al. The *Leishmania* nicotinamidase is essential for NAD⁺ production and parasite proliferation. *Molecular Microbiology*, v. 82, n. 1, p. 21–38, 2011.

INCEBOZ, T. Epidemiologia e ecologia da leishmaniose. In: *Tópicos atuais em doenças tropicais negligenciadas*. Londres: IntechOpen, 2019. p. 1–15.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 10, p. 1443–1474, 2012.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. *The leishmaniasis in biology and medicine: evolution, classification and geographical distribution*. London: Academic Press, 1987.

LEVINSON, W. *Microbiologia médica e imunologia*. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016.

MANDAL, G. et al. Resistência a medicamentos em *Leishmania*. In: *Resistência a medicamentos antimicrobianos*. Londres: Springer, 2017. p. 649–665.

MARCHESE, L. et al. The uptake and metabolism of amino acids, and their unique roles in the biology of protozoan parasites. *Parasitology*, v. 145, n. 10, p. 1334–1347, 2018.

MICHELS, P. A. M.; AVILÁN, L. The NAD⁺ metabolism of *Leishmania*, notably the enzyme nicotinamidase involved in NAD⁺ salvage, offers prospects for development of anti-parasite chemotherapy. *Molecular Microbiology*, v. 82, n. 1, p. 4–8, 2011.

MORAIS-TEIXEIRA, E. et al. In vitro and in vivo activity of meglumine antimoniate, amphotericin B and miltefosine against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 1, p. 143–148, 2011.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, v. 366, p. 1561–1577, 2005.

NASCIMENTO, L. M. *Análise comparativa da expressão de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G ao longo do ciclo de vida de Leishmania amazonensis*. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

NEIRA, I. et al. Biological and molecular characterisation of in vitro selected miltefosine-resistant *Leishmania (Leishmania) infantum*. *MicrobiologyOpen*, v. 14, n. 1, e12510227, 2025.

RAKOTOMANGA, M. et al. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 4, p. 1425–1430, 2007.

REAL, F.; POUCHELET, M.; RABINOVITCH, M. *Leishmania (L.) amazonensis*: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow-derived mouse macrophages. *Experimental Parasitology*, v. 119, p. 15–23, 2008.

ROGERS, S. et al. Probabilistic assignment of formulas to mass peaks in metabolomics experiments. *Bioinformatics*, v. 25, p. 512–518, 2009.

SALOTRA, P.; SINGH, R. Challenges in the diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, v. 123, p. 295–310, 2006.

SARKARI, B.; REZAEI, Z.; MOHEBALI, M. Immunodiagnosis of visceral leishmaniasis: current status and challenges. *Iranian Journal of Parasitology*, v. 13, n. 3, p. 331, 2018.

SAKYI, P. O. et al. Unravelling the myth surrounding sterol biosynthesis as plausible target for drug design against leishmaniasis. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 45, n. 4, p. 1152–1171, 2021.

SEBLOVA, V. et al. The biting midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) is capable of developing late stage infections of *Leishmania enriettii*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 9, e0004060, 2015.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.

SON, R. D. *Leishmaniose*. In: *Manual MSD*. 2017. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/protozo%C3%A1rios--extraintestinais/leishmaniose>. Acesso em: 22 jul. 2025.

THEODORIDIS, G. A. et al. Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. *Analytica Chimica Acta*, v. 711, p. 7–16, 2012.

VINCENT, I. M. et al. Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 4, n. 1, p. 20–27, 2014.

WESTROP, G. D. et al. Metabolomic analyses of *Leishmania* reveal multiple species differences and large differences in amino acid metabolism. *PLoS One*, v. 10, n. 9, e0136891, 2015.

XU, W. et al. Sterol biosynthesis is required for heat resistance but not extracellular survival in *Leishmania*. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 10, e1004427, 2014.

ZARE, M. et al. A machine learning-based system for detecting leishmaniasis in microscopic images. *BMC Infectious Diseases*, v. 22, n. 1, p. 1–6, 2022.

ZEIBIG, E. A. *Clinical hematology*. Londres: Elsevier Health Sciences, 2014.